

Cyclin E: Struktur - Funktionsbeziehungen und Implikationen für die Tumorentstehung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur

an der

Universität Essen

vorgelegt von

Christoph Geisen

aus Bendorf

April 2001

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität Gesamthochschule Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Tarik Möröry

2. Gutachter: Prof. Dr. Günther Obe

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Dr. Hans-Werner Denker

Tag der mündlichen Prüfung: 15. August 2001

Meiner Familie

„Eigentlich weiß man nur, wenn man wenig weiß;
mit dem Wissen wächst der Zweifel.“

Johann Wolfgang von Goethe

”Many are the times we were ready to
throw the whole thing out of the window!”
Oswald Avery, speaking about his research
work on the transforming principle

Inhaltsverzeichnis**Seite**

1.	Einleitung	1
1.1	Einführung: Was versteht man unter dem Begriff Zellzyklus?	1
1.2	Der Zellzyklus als reguliertes und regulierendes System	4
1.2.1	Kinasen, die den Zellzyklus steuern	4
1.2.1.1	Cycline	4
1.2.1.2	Cyclin abhängige Kinasen (Cdks)	9
1.2.2	Regulation von Kinasen, die den Zellzyklus steuern	12
1.2.2.1	Inhibitoren von zellzyklussteuernden Kinasen	13
1.2.2.1.1	Inhibitoren der Ink4-Familie	13
1.2.2.1.2	Proteine der Cip/Kip-Familie	14
1.2.2.2	Regulation der Cyclinverfügbarkeit	16
1.2.2.2.1	Transkriptionelle Regulation der Cycline	16
1.2.2.2.2	Posttranslationale Regulation der Cyclinstabilität	18
1.2.2.3	Subzelluläre Lokalisation von zellzyklusregulatorischen Proteinen	19
1.2.2.4	Regulation der Aktivität von Cdks durch den Phosphorylierungsstatus	20
1.2.3	Substrate der zellzyklusregulatorischen Kinasen	21
1.2.4	Signalintegration auf der Ebene des Zellzyklus	22
1.2.5	Kontrolle des G ₁ -/S-Phase-Überganges	22
1.3	Der Zellzyklus in der Tumorigenese	23
1.3.1	Tumorsuppressorgene überwachen den Zellzyklus	24
1.3.2	Onkogene regulieren den Zellzyklus	25
1.4	Cyclin E in der Onkogenese	25
1.5	Fragestellung: Welche sind die notwendigen und hinreichenden Eigenschaften von Cyclin E während der Transformation von Zellen?	28
2.	Ergebnisse	29
2.1	Mutanten und Spleißvarianten des zellzyklusregulatorischen Proteins Cyclin E	29
2.2	Analyse der „physiologischen“ Funktionsfähigkeit von Cyclin E-Mutanten	31
2.2.1	Transformation von primären Ratten-Embryo-Fibroblasten (REF) durch Cyclin E und seine Mutanten	31
2.2.2	Beschleunigung der Zellzyklusprogression durch Cyclin E-Mutanten	34
2.2.3	Funktionsanalyse von Cyclin E-Mutanten in <i>S. cerevisiae</i>	37
2.3	Identifikation der Interaktionsfähigkeit von Cyclin E-Mutanten mit Partnerproteinen	42
2.3.1	<i>In vitro</i> Interaktion von Cyclin E-Mutanten mit Cdk2 und p27 ^{Kip1}	42
2.3.2	<i>In vitro</i> Aktivierung von Cdk2 durch Cyclin E-Mutanten	46
2.3.3	<i>In vivo</i> Analyse der Interaktionen von Cyclin E mit dem 2-Hybrid-System	47
2.3.4	Analyse des Abbaus von Cyclin E-Mutanten durch Ubiquitinierung	53
2.4	Etablierung und Analyse stabiler, Cyclin E-Mutanten überexprimierender REF-Zelllinien	55
2.4.1	Analyse des RNA-Expression etablierter REF-Zelllinien	55
2.4.2	Protein-Expressionskontrolle in etablierten REF-Zelllinien	56

2.4.3	Analyse der <i>in vivo</i> an Cyclin E-Mutanten gebundenen Proteine und deren Kinaseaktivität	59
2.4.4	Untersuchung zur Zellzyklusverteilung von Cyclin E transformierten REF-Zelllinien	62
2.4.5	<i>Cyclin E</i> -Expression vermittelt eine Resistenz gegen Nocodazol-induzierten M-Phase-Arrest	64
2.5	Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Cyclin E-Mutanten	67
2.5.1	Analyse der subzellulären Lokalisation von Cyclin E-Mutanten in NIH3T3-Zellen	67
2.5.2	Cyclin E-Mutanten sind in REF-Zelllinien nukleär lokalisiert	72
3.	Diskussion	74
3.1	Transformation durch Cyclin E ist unabhängig von Cdk2-Bindung und -Aktivierung	74
3.2	p27 ^{Kip1} -Inaktivierung ist notwendig für die Tumorigenität von Cyclin E	77
3.3	Die Lokalisation von Cyclin E ist abhängig von CKIs	77
3.4	Neue Eigenschaften von Cyclin E in der Regulation der Mitose	80
3.5	Perspektive	81
4.	Zusammenfassung	83
5.	Material & Methoden	85
5.1	Materialien	85
5.1.1	Eingesetzte Reagenzien & Materialien	85
5.1.2	Laborgeräte	85
5.1.3	Verwendete Computerprogramme	86
5.2	Lösungen	86
5.3	Medien	87
5.3.1	Antibiotika	87
5.3.2	Medien für Bakterien	87
5.3.3	Medien für Hefen	87
5.3.4	Medien für die Zellkultur	88
5.4	Organismen	88
5.4.1	Bakterienstämme	88
5.4.2	Hefestämme	89
5.4.3	Zelllinien	89
5.4.4	Ratten	89
5.5	Verwendete Antikörper	89
5.6	Verwendete Plasmide und cDNAs	89
5.7	Verwendete Oligodesoxynukleotide	91
5.8	Arbeiten mit DNA und RNA	91
5.8.1	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	91
5.8.2	Transformation von Bakterien	91
5.8.3	Kultivierung von Bakterienzellen	91
5.8.4	Isolierung von Plasmid-DNA in kleinen Mengen (Mini-Präp)	92

5.8.5	Isolierung von Plasmid-DNA in großen Mengen (Maxi-Präp)	92
5.8.6	Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen	92
5.8.7	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA in wässriger Lösung	93
5.8.8	Restriktionsendonukleaseverdau von DNA	93
5.8.9	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	93
5.8.10	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	93
5.8.11	Konversion überhängender 5'- bzw. 3'-DNA-Enden	93
5.9.12	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten an den 5'-Enden	94
5.8.13	Hybridisierung und Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden	94
5.8.14	Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation und Modifikation von cDNAs	94
5.8.15	Ligation von DNA-Fragmenten	95
5.8.16	Sequenzierung von DNA	95
5.8.17	Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Sonden	95
5.8.18	Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA	96
5.8.19	Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern Blot)	96
5.8.20	Hybridisierung und Autoradiographie von geladenen Nylonmembranen	96
5.9	Arbeiten mit Proteinen	97
5.9.1	Gesamtproteinextraktion aus <i>E. coli</i>	97
5.9.2	Gesamtproteinextraktion aus <i>S. cerevisiae</i>	97
5.9.3	Gesamtproteinextraktion aus eukaryontischen Zellen	98
5.9.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen in wässriger Lösung	98
5.9.5	<i>in vitro</i> Translation von Proteinen	98
5.9.6	Rekombinante Proteinexpression in <i>E. coli</i>	98
5.9.7	Rekombinante Proteinexpression in Sf9-Zellen durch Baculoviren	99
5.9.7.1	Transfektion von Sf9-Zellen	99
5.9.7.2	Isolierung rekombinanter Baculoviren	99
5.9.7.3	Anlegen einer Virus-Stammlösung	100
5.9.7.4	Infektion von Sf9-Kulturen mit rekombinanten Baculoviren	100
5.9.8	Isolierung und Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine	100
5.9.9	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	100
5.9.10	Transfer von Proteinen auf eine Nylonmembran (Immun-(Western-)Blot)	101
5.9.11	Ko-Präzipitation von Proteinkomplexen <i>in vitro</i>	102
5.9.12	Ko-Immunpräzipitation von Proteinkomplexen <i>in vivo</i>	102
5.9.13	Kinase-Assay	102
5.10	Arbeiten mit <i>S. cerevisiae</i>	103
5.10.1	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	103
5.10.2	Transformation von Hefezellen	103
5.10.3	Etablieren von Hefeklonen	104
5.10.4	Einfrieren und Auftauen von Hefezellen	104
5.11	Arbeiten mit Zellen in der Gewebekultur	104
5.11.1	Kultivierung und Passagierung von Zellen	104

5.11.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	104
5.11.3	Transfektion von Zellen.....	104
5.11.4	Kontrolle der Transfektionseffizienz	105
5.11.5	REF-Transformations-Assay	105
5.11.6	Etablierung von Zelllinien aus stabil transformierten REF.....	106
5.11.7	Analyse des Zellzyklusverteilung mittels Durchflußzytometrie	106
5.11.8	Zellproliferations-Assay	107
5.11.9	Immunfluoreszenz- und Fluoreszenz-Präparation	108
5.11.10	Analyse von Proteininteraktionen mit dem 2-Hybrid-System.....	108
6.	Literatur.....	108
7.	Anhang.....	130
7.1	Plasmide & Oligoseoxynukleotide	130
7.2	Akademische Lehrer	134
7.3	Lebenslauf	135
7.4	Publikationsliste.....	136
7.5	Danksagung.....	138
7.6	Ehrenwörtliche Erklärung	140

Abbildungsverzeichnis	Seite
Abb. 1: Schematische Darstellung des Zellzyklus.....	2
Abb. 2: Die mikroskopisch sichtbaren Zellzyklusvorgänge.....	3
Abb. 3: Schematische Darstellung der Cyclin-Expression innerhalb des Zellzyklus.....	5
Abb. 4: Schema der Cyclin E-Funktionen.....	9
Abb. 5: Schematische Darstellung der Kristallstruktur von Cdk2 gebunden an Cyclin A.....	11
Abb. 6: Schema der Regulationsvorgänge, durch die Cyclin abhängige Kinasen gesteuert werden.....	12
Abb. 7: Schema der Regulation der Cyclin Expression durch pRb- und APC-Proteinkomplexe.....	17
Abb. 8: Schema der Cyclin Degradation am Beispiel von Cyclin E.....	18
Abb. 9: Die Regulation des G ₁ -S-Phasen-Übergangs.....	23
Abb. 10: Schema der publizierten Spleißvarianten des humanen Cyclin E-Proteins und ihrer bekannten Eigenschaften.....	29
Abb. 11: Schematische Darstellung der generierten bzw. zur Verfügung gestellten Cyclin E-Mutanten.....	30
Abb. 12: Kontrolle der Expression von pLTR-MCS+-Plasmiden.....	31
Abb. 13: Graphische Darstellung der transformierenden Eigenschaften von Cyclin E-Mutanten.....	32
Abb. 14: Durchflußzytometrische Analyse transient transfizierter NIH3T3-Zellen.....	36
Abb. 15: Analyse der Fähigkeit von Cyclin E-Mutanten die G ₁ -S-Progression in NIH3T3-Zellen zu beschleunigen.....	37
Abb. 16: Analyse der Komplementation der <i>cln1,2,3</i> Defizienz in <i>S. cerevisiae</i> durch Cyclin E-Mutanten.....	39
Abb. 17: Nachweis der Proteinexpression der Cyclin E-Mutanten in <i>S. cerevisiae</i>	40
Abb. 18: Analyse der Toxizität von Cyclin E-Mutanten in <i>S. cerevisiae</i>	41
Abb. 19: Zusammenfassung der Ergebnisse von 2.2.....	42
Abb. 20: <i>In vitro</i> Translation von Cyclin E-Mutanten.....	43
Abb. 21: Immunpräzipitation von <i>in vitro</i> translatierten Cyclin E-Mutanten und RGS-6xHis-Cdk2.....	44
Abb. 22: Immunpräzipitation von <i>in vitro</i> translatierten Cyclin E-Mutanten und RGS-6xHis-p27Kip1.....	45
Abb. 23: Untersuchung der <i>in vitro</i> Kinaseaktivierung durch Cyclin E-Mutanten.....	47
Abb. 24: Immun Blot-Expressionskontrolle von VP16-Hybridproteinen in HeLa-Zellen.....	49
Abb. 25: Untersuchung der Interaktion von Cyclin E-Mutanten mit Cdk2, p21 ^{Cip1} bzw. p27 ^{Kip1} mit dem 2-Hybrid-System.....	50
Abb. 26: Kontrolle der Spezifität der Interaktionen im 2-Hybrid-System.....	51
Abb. 27: Analyse der Interaktion von Cyclin E-Mutanten mit p130 bzw. p45 ^{Skp2} mit dem 2-Hybrid-System.....	52
Abb. 28: Cyclin E-Mutanten werden ubiquitiniert.....	54
Abb. 29: Zusammenfassung der in 2.3 beobachteten Eigenschaften von Cyclin E und seinen Mutanten.....	55

Abb. 30:	Northern Blot Analyse etablierter REF-Zelllinien.....	56
Abb. 31:	Immun Blot Analyse etablierter REF-Zelllinien.....	58
Abb. 32:	Analyse der <i>in vivo</i> Cdk2-Bindung von Cyclin E-Mutanten.....	59
Abb. 33:	Analyse der <i>in vivo</i> Aktivierung von Cdk2 durch Cyclin E-Mutanten.....	60
Abb. 34:	Analyse der <i>in vivo</i> an Cyclin E-Mutanten gebundenen Proteine.....	60
Abb. 35:	Immun Blot Analyse etablierter REF-Zelllinien.....	61
Abb. 36:	Analyse der <i>in vivo</i> Cdk2-Bindung und -Aktivierung durch Cyclin E-GFP-Fusionsproteine.....	62
Abb. 37:	Durchflußzytometrische Analyse von REF-Zelllinien.....	63
Abb. 38:	Analyse des Wachstumsverhaltens ausgewählter REF-Zelllinien.....	65
Abb. 39:	FACS-Analyse von Nocodazol behandelten REF-Zelllinien.....	66
Abb. 40:	Analyse der subzellulären Verteilung von Cyclin E-Mutanten.....	68
Abb. 41:	p27 ^{Kip1} -Red1 beeinflusst die subzelluläre Verteilung von Cyclin E-Mutanten.....	69
Abb. 42:	p21 ^{Cip1} -Red1 bewirkt eine subzelluläre Umverteilung von Cyclin E-Mutanten.....	70
Abb. 43:	Überexpression von Cyclin E-Mutanten bewirkt eine subzelluläre Umverteilung von exogenem Cdk2-Red1.....	71
Abb. 44:	Analyse der subzellulären Verteilung von Cyclin E-Mutanten bei Kotransfektion von p16 ^{Ink4a} -Red1.....	72
Abb. 45:	Cyclin E-Mutanten sind in transformierten REF-Zellen zytoplasmatisch lokalisiert.....	73

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
APC/C	engl.: <u>a</u> naphase <u>p</u> romoting <u>c</u> omplex / <u>c</u> yclosome
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	engl.: <u>a</u> lternative <u>r</u> eading <u>f</u> rame protein
AS	<u>A</u> minosäure(n)
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> risphosphat
ATM	engl.: <u>A</u> taxia-telangiectasia <u>m</u> utated protein kinase
ATR	engl.: <u>A</u> TM + <u>R</u> ad3-related protein kinase
bp	<u>B</u> asenpaare
BSA	engl.: <u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin
cdk	engl.: <u>c</u> yclin <u>d</u> ependent <u>k</u> inase
cDNA	engl.: <u>c</u> omplementary DNA
Ci	Curie
Cip	engl.: <u>c</u> dk <u>i</u> nteracting protein
CKI	engl.: <u>c</u> yclin dependent <u>k</u> inase <u>i</u> nhibitor
CMV	<u>C</u> ytomegalie <u>v</u> irus
cpm	engl.: <u>c</u> ounts per <u>m</u> inute
dATP	<u>D</u> esoxyadenosin <u>t</u> risphosphat
dCTP	<u>D</u> esoxycytosin <u>t</u> risphosphat
DEPC	<u>D</u> iethylpyro <u>c</u> arbonat
DMEM	Dulbecco's modified <u>E</u> agle's <u>m</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethylsulfo <u>y</u> d
DNA	engl.: <u>D</u> esoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
Δ Exxx	Extinktionsdifferenz zum Leerwert bei der Wellenlänge xxx nm
DTT	<u>D</u> ithiothreitol
EDTA	engl.: <u>e</u> thylendiamintetraacetic acid
Fa	Firma
FACS	engl.: <u>f</u> luorescence <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orter
FCS	engl.: <u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum
FITC	Fluoresceinisothocyanat
GSK3 β	engl.: glycogen synthase <u>k</u> inase <u>3</u> β
h	engl.: <u>h</u> our
Ink4	<u>I</u> nhibitor der Cyclin abhängigen <u>K</u> inase <u>4</u>
IPTG	Isopropyl β -D-Thiogalactopyranosid
kb	<u>K</u> ilobasen
kDa	<u>K</u> ilodalton
Kip	engl.: <u>k</u> inase <u>i</u> nhibitory protein
LLNL	N-Acetyl-L-Leuciny-L-Leucinal-L-Norleucinal
m	<u>M</u> eter
min	<u>M</u> inute
MOPS	<u>M</u> orpholinopropansulfonsäure
mRNA	engl.: <u>m</u> essenger RNA
μ M	<u>M</u> ikrometer (10^{-6} m)
NC	<u>N</u> itrocellulose
nm	<u>N</u> anometer (10^{-9} m)
OD	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	engl.: <u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline

Ras	engl.: <u>r</u> at <u>s</u> arcoma protein
REF	<u>R</u> atten <u>E</u> mbryo <u>F</u> ibroblasten
RLU	engl.:relative <u>l</u> ight <u>u</u> nit
RNA	engl.: <u>R</u> ibon <u>u</u> cleic acid
rpm	<u>R</u> otationen pro <u>M</u> inute
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
SCF	<u>S</u> kp1- <u>c</u> ullin- <u>F</u> -box-Komplex
SDS	engl.: <u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate
s	engl.: <u>s</u> econd
Skp	engl: <u>S</u> -phase <u>k</u> inase associated protein
Smad	engl.: <u>S</u> ma and <u>M</u> ad (mothers against decapentaplegic)
SSC	engl.: <u>S</u> odium Chloride <u>S</u> odium <u>c</u> itrate
Tab.	Tabelle
TAE	<u>T</u> ris <u>A</u> ccetat <u>E</u> DTA Puffer
TBE	<u>T</u> ris <u>B</u> orat <u>E</u> DTA Puffer
TBS	engl.: <u>T</u> ris <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
TE	<u>T</u> ris- <u>E</u> DTA-Puffer
TEMED	<u>N</u> ′, <u>N</u> , <u>N</u> ′, <u>N</u> ′- <u>T</u> etramethyl <u>d</u> iamin
TGF-β	engl.: transforming growth factor β
Tris	2-Amino-2(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
Upm	<u>U</u> mdrehungen pro <u>M</u> inute
V	<u>V</u> olt
v/v	<u>V</u> olumen pro <u>V</u> olumen
W	<u>W</u> att
wt	<u>W</u> ildtyp
w/v	Gewicht pro <u>V</u> olumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl β-D-Galactopyranosid

1. Einleitung

1.1 Einführung: Was versteht man unter dem Begriff Zellzyklus?

(Nurse, 2000)

Zu den grundlegenden Charakteristika eines jeden Organismus gehört neben dem Stoffwechsel und der Fortpflanzung auch das Wachstum. Da bei mehrzelligen Organismen im Gegensatz zu Einzellern das Wachstum weniger durch Volumenzunahme der Einzelzellen, als vielmehr durch eine Vermehrung der Zellzahl gekennzeichnet ist, bedingt dies die Fähigkeit der Einzelzelle sich durch Zellteilung zu reproduzieren. Die nach einem bestimmten Programm ablaufenden und immer wiederkehrenden Phasen des Wachstums und der Teilung einer einzelnen Zelle nennt man Zellzyklus. Dies ist die „software“ nach der sich eine proliferierende Zelle richtet, um alle lebensnotwendigen Bestandteile, als wichtigste Komponente das Genom, zu replizieren. Somit kann man diejenigen Gene und Proteine, die dieses Programm ausführen, als „tools“ bezeichnen und die von ihnen gesteuerte Zelle als „hardware“.

Reduziert man den eukaryontischen Zellzyklus auf seine einfachste Form, so besteht er nur aus zwei biochemisch inkompatiblen Ereignissen, die deshalb in zwei zeitlich streng voneinander getrennten Phasen ablaufen: Der Replikation des Erbgutes in der Synthesephase (S-Phase) und dessen Segregation in zwei neue Tochterzellen während der Mitose (M-Phase). Eine solche, einfache Form des Zellzyklus findet man allerdings nur in Prokaryonten (Autret, *et al.*, 1997). Ebenso tritt eine vereinfachte Form des Zellzyklus während der autonom ablaufenden, frühen Teilungen der Embryogenese eines höheren Organismus (z.B in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* oder beim Krallenfrosch *Xenopus laevis*.) auf (Masui und Wang, 1998; Orr-Weaver, 1994).

Da eine Zelle auf Stimuli von außen reagieren können muß, ist eine zeitliche Ausdehnung des Zellzyklus über die Replikation des Erbgutes und die Teilung der Zelle hinaus notwendig. Ebenso bedingt die Zunahme der Komplexität des Genoms und des Organismus eine Vielzahl von Kontrollen, um die Weitergabe fehlerhaften Erbgutes zu verhindern und die Lebensfähigkeit der entstehenden Zellen zu gewährleisten. Daher wird sowohl der Vorgang der Replikation des Genoms und der notwendigen Zellorganellen, als auch deren korrekte Verteilung auf die neuen Zellen intensiv überprüft. Während der Evolution hat sich der Zellzyklus zu einem stark konservierten Musterprogramm entwickelt, das allen höheren Zellen gemein ist und das sowohl vor als auch nach den entscheidenden Phasen der Replikation und der Segregation eine Ruhephase besitzt, in denen diese Kontrollfunktionen ausgeführt werden können. In Eukaryonten teilt man den Zellzyklus generell in vier Phasen ein: G_1 -, S-, G_2 - und die M-Phase oder auch erste Ruhephase (engl.: gap phase 1 (engl.: gap = Lücke)), Synthesephase (engl.: synthesis phase), zweite Ruhephase (engl.: gap phase 2) und die Mitose (engl.: mitotic phase) (Mitchison, 1971) (s. Abb. 1 & 2). Dabei werden die Phasen G_1 , S und G_2 zusammen als Interphase bezeichnet, da man zunächst auf Grund der beschränkten technischen Möglichkeiten nur zwischen mitotischen und nichtmitotischen (= Interphase-) Zellen unterscheiden konnte. Diese vier Abschnitte des Zyklus sind von unterschiedlicher Dauer und ihre Namen lassen schon auf verschiedene Unterprogramme schließen, die in diesen Phasen ablaufen.

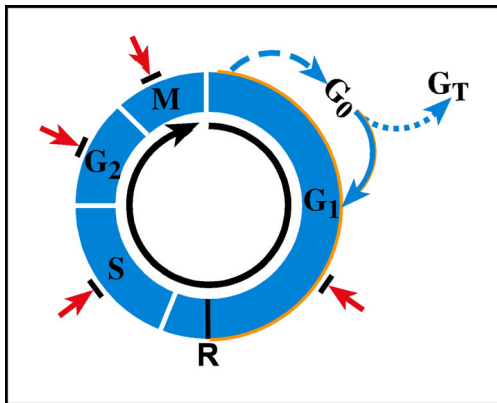


Abb. 1: Schematische Darstellung des Zellzyklus

Die einzelnen Phasen des Zellzyklus sind durch blaue Bereiche symbolisiert. Der orange markierte Teil der G_1 -Phase stellt den Zeitraum der möglichen mitogenen Einflußnahme dar. Die roten Pfeile stellen die einzelnen Kontrollpunkte (checkpoints) dar.

G_1 = erste Ruhephase, S = Synthesephase, G_2 = zweite Ruhephase, M = Mitose, G_0 = Dauerruhephase, G_T = terminales Differenzierungsstadium

Während der G_1 -Phase erhöht sich das Zellvolumen und die Anzahl der Organellen wie Mitochondrien, Lysosomen, Golgivesikel etc.. Im Gegensatz dazu findet während der folgenden S-Phase ein reger Stoffwechsel zum Aufbau aller notwendigen Baustoffe für die in dieser Phase ablaufende Replikation der DNA statt, um die korrekte Verdoppelung des Chromosomensatzes zu bewerkstelligen. Außerdem beginnt in der S-Phase die Verdoppelung des Zentrosoms, die in der folgenden G_2 -Phase abgeschlossen wird. Weiterhin wird in der G_2 -Phase die korrekte Replikation des Genoms kontrolliert und danach die Mitose eingeleitet.

Die M-Phase ist der auffälligste und am einfachsten zu beobachtende Teil des Zyklus, denn dabei werden die Chromosomen so stark kondensiert, daß sie lichtmikroskopisch gut zu beobachten sind. Die Mitose wird nochmals in die Abschnitte Pro-, Prometa-, Meta-, Ana- und Telophase unterteilt und bildet zusammen mit der den Zellzyklus abschließenden Zytokinese die M-Phase. Innerhalb der Mitose werden die kondensierten Chromosomen in ihre Einzelchromatiden geteilt und zusammen mit den übrigen Zellorganellen auf die neu entstehenden Tochterzellen verteilt (s. Abb. 2).

Eine weitere Station einer Zelle während des Zellzyklus ist die G_0 -Phase. Dabei handelt es sich um eine Ruhephase, in der sich die meisten Zellen eines höheren Organismus befinden. Durch das Fehlen von Wachstumssignalen, z.B. Hormonen, Wachstumsfaktoren oder Nährstoffen, geht eine Zelle aus der G_1 -Phase in die G_0 -Phase über bzw. durch das Auftreten solcher Signale wird sie in den Zyklus zurückgeführt. Seneszenz oder terminale Differenzierung läßt eine Zelle jedoch irreversibel den Zellzyklus verlassen und in ein terminales Differenzierungsstadium G_T eintreten, auf welches nur noch der Zelltod durch Nekrose oder Apoptose folgen kann.

Wie schon erwähnt, werden die Ruhephasen G_1 und G_2 von den Zellen zur Kontrolle benutzt, dies passiert ebenso in der S- und M-Phase. Dabei ist die Überprüfung der Intaktheit des Erbgutes der wichtigste Vorgang an diesen Kontrollpunkten (engl.: checkpoints). Bei fehlerhaftem Erbgut kommt es zu einem Arrest des Zellzyklus, der sowohl in der G_1 - als auch in der S-, G_2 - oder M-Phase auftreten kann (Hardwick, 1998; Larner, *et al.*, 1997; O'Connor, 1997). Diese erzwungene Pause wird zur Reparatur der Schäden an der DNA oder, falls diese irreparabel sind, zur Einleitung der Apoptose genutzt. Ein weiterer wichtiger Kontrollpunkt liegt in der späten G_1 -Phase und wird in höheren Eukaryonten Restriktionspunkt (R-Punkt) und in Hefe Start (-Punkt) genannt (Hartwell, *et al.*, 1974; Hartwell und Weinert, 1989; Murray, 1992; Pardee, 1989). Während eine Zelle in der frühen bis mittleren G_1 -Phase den Zellzyklus reversibel oder irreversibel in die G_0 -Phase verlassen und auf Wachstumsstimuli von außen reagieren kann, ist sie nach Passage des R-Punktes unwiderruflich determiniert in die S-Phase

einzutreten und den weiteren Zyklus zu durchlaufen, ohne daß extrazelluläre (anti-) mitogene Signale dies beeinflussen können. Das bedeutet, daß der Restriktionspunkt das wichtigste Zugangstor des Zellzyklus darstellt und er nur passiert werden darf, wenn alle positiven und negativen Wachstumssignale integriert wurden um der Zelle das „Okay“ zu geben eine neue Runde der Replikation zu beginnen. Daher enden bei dieser wichtigen Kontrollinstanz viele verschiedene Signalwege, deren Botschaften berücksichtigt werden, um die richtige Entscheidung: Replikation oder nicht, treffen zu können. Davon hängt ein normales Funktionieren der Einzelzelle, sowie des Gewebeverbandes und des gesamten Organismus ab. Neben der bislang hauptsächlich auf das Wachstum eines Organismus bezogenen Beschreibung des Zellzyklus spielt dieser auch im adulten, nicht mehr wachsenden Organismus eine entscheidende Rolle, so z.B. bei der Wundheilung, der Organregeneration nach Operationen, ebenso wie bei der Immunantwort und in proliferierenden Geweben wie der Haut oder dem Darmepithel.

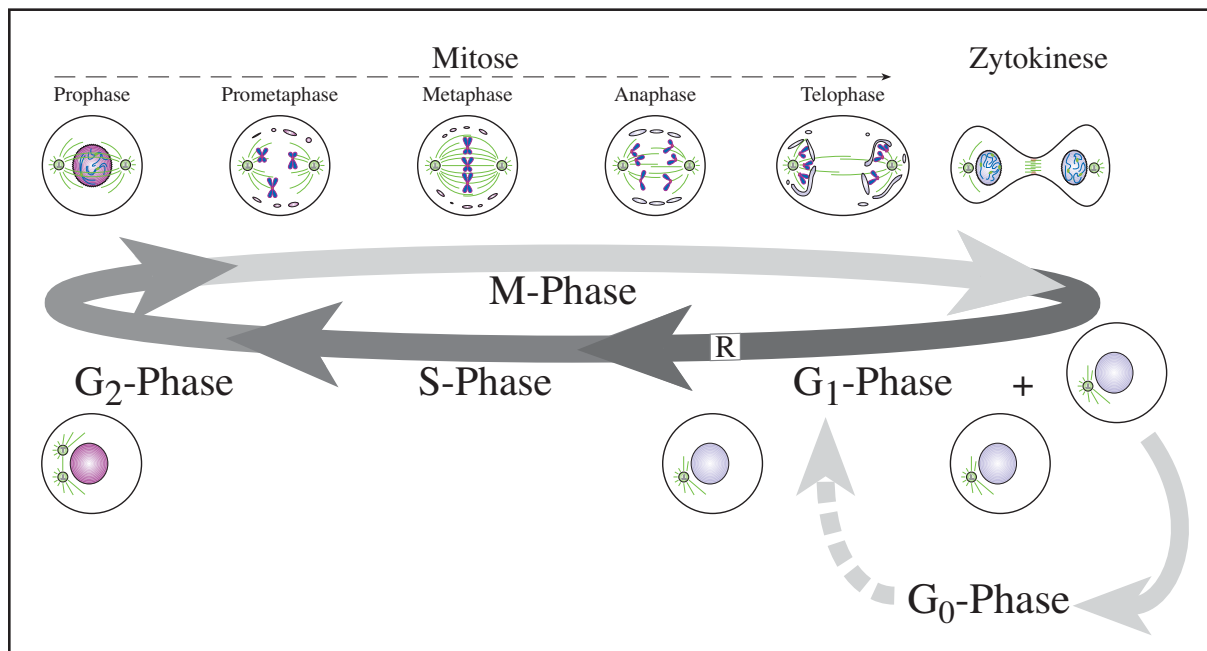


Abb. 2: Die mikroskopisch sichtbaren Zellzyklusvorgänge.

Die einfach zu beobachtenden Prozesse der Kern- (Mitose) und Zellteilung (Zytokinese), die als M-Phase zusammengefaßt werden, nehmen normalerweise nur einen kleinen Teil des Zellzyklus in Anspruch. Der restliche, viel längere Teil ist die sog. Interphase, bestehend aus G₁-, S- und G₂-Phase. Die einzelnen Phasen des Zellzyklus sind durch graue Pfeile symbolisiert. G₁ = erste Ruhephase, S = Synthesephase, G₂ = zweite Ruhephase, M = Mitose, G₀ = Dauerruhephase

Auf Grund der großen Bedeutung der korrekten Funktion des Zellzyklus und seiner Kontrollmechanismen für den Fortbestand eines Organismus erscheint seine Deregulation als fatales Ereignis, das entweder im Zelltod (Apoptose oder Nekrose) endet oder in die maligne Transformation münden kann. Daher sind die beteiligten Gene und ihre Produkte von herausragendem Interesse, insbesondere da einige als Protoonkogene bzw. Tumorsuppressorgene identifiziert wurden (Hanahan und Weinberg, 2000; Kastan, 1997). Die Analyse des Zellzyklus und der beteiligten Gene und Proteine dient also nicht nur dem besseren Verständnis physiologischer Wachstums- und Teilungsvorgänge, sondern auch der Erforschung maligner Erkrankungen und ihrer Therapie.

Im Folgenden soll auf Konstituenten des Zellzyklus höherer Eukaryonten und deren Verbindung zu malignen Erkrankungen näher eingegangen werden.

1.2 Der Zellzyklus als reguliertes und regulierendes System

Auf der Ebene des Zellzyklus werden verschiedenste Signale integriert, weiterverarbeitet und neue Signale ausgesandt. Entscheidend für die Funktionsfähigkeit der Zellzyklusmaschinerie sind ihre einzelnen Komponenten, deren Funktion und Zusammenspiel im Weiteren erläutert werden sollen.

1.2.1 Kinasen, die den Zellzyklus steuern

Viele der entscheidenden Elemente der Zellzyklusregulation wurden durch Komplementationsversuche von Hefenmutanten, die einen Zellzyklusdefekt aufwiesen, entdeckt. Dabei sind z.B. die beiden Hefeproteine cdc2 und Cdc28 aus *Schizosaccharomyces pombe* bzw. *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben worden, welche die Prototypen einer von den Hefen bis hin zum Menschen hoch konservierten Familie von Proteinkinasen darstellen, die den Zellzyklus an entscheidenden Stellen regulieren. Die aktivierenden Partner dieser Kinasen wurden ursprünglich entdeckt, als man nach Proteinen suchte, deren Menge während des Zellzyklus sich entwickelnder Eier mariner Wirbelloser schwankt (Evans, *et al.*, 1983). Auf Grund dieses zyklischen Auftretens nannte man sie „Cycline“. Es wurde angenommen, daß diese Oszillation während des Zellzyklus eine Bedeutung für die Kontrolle desselben hat, was zur Identifikation der Cyclin abhängigen Kinasekomplexe führte. Diese bestehen aus einer katalytischen (Cdk, engl.: cyclin dependent kinase) und einer regulatorischen (Cyclin) Untereinheit.

1.2.1.1 Cycline

(Roberts, 1999)

Durch ihre zyklische Expression sind die Cycline die charakteristischen Proteine des Zellzyklus schlechthin. Ihr Vorhandensein, bzw. ihre Abwesenheit, kann als Marker für die Phase des Zyklus, in dem sich eine Zelle befindet, angesehen werden. So treten die Cycline des D-Types vermehrt in der G₁-Phase auf, während B-Typ-Cycline am stärksten in der M-Phase exprimiert (s. Abb. 3) und an deren Ende sofort wieder abgebaut werden. Außerdem weist die zeitlich begrenzte Expression auf spezialisierte Aufgaben der jeweiligen Cycline in Kooperation mit ihren Cdk-Partnern hin. Weiterhin ist neben der aktivierenden Eigenschaft der Cycline auch eine selektive, in Bezug auf die von einem Cyclin/Cdk-Komplexe zu phosphorylierenden Substrate hin, vorhanden.

Die Familie der Cycline definiert sich mittlerweile nicht mehr ausschließlich über die zyklische Expression der Mitglieder, denn es gibt auch Cycline deren Vorhandensein nicht schwankt, z.B. Cyclin I (Nakamura, *et al.*, 1995), sondern hauptsächlich über das Vorhandensein eines ca. 100 Aminosäuren (AS) großen Proteinkonsensusmotiv, das als „Cyclin-Box“ bezeichnet wird (Hunt, 1991). Dieser Bereich innerhalb eines Cyclin-Proteins besteht aus 5 α -Helices und dient

der Bindung und Aktivierung der zugehörigen Kinase (Kobayashi, *et al.*, 1992; Lees und Harlow, 1993) (s. Abb. 4). Die Kristallstrukturen von Cyclin H, sowie von Cyclin A gebunden an Cdk2 (s. Abb. 5) bestätigen die Cdk-Bindungsfunktion der zentralen, α -helicalen „Cyclin-Box“-Domäne und das Motive außerhalb dieser die Spezifität der Cycline bedingen (Andersen, *et al.*, 1997; Jeffrey, *et al.*, 1995; Kim, *et al.*, 1996; Russo, *et al.*, 1996b). Weiterhin wird der „Cyclin-Box“ eine generelle Funktion als Adaptermotiv bei der Erkennung von DNA und Proteinen, die in der Zellzyklus- und Transkriptionskontrolle involviert sind, zugeschrieben (Noble, *et al.*, 1997). Man könnte also eine weitere Unterteilung der Cycline in a) Zellzyklusregulatoren und b) Transkriptionsregulatoren vornehmen. Außer der „Cyclin-Box“ weisen die in G_1 exprimierten Cycline alle eine sogenannte „PEST-Box“-Sequenz auf, die ebenso wie die für die mitotischen Cycline charakteristische 10 AS große „Destruction-Box“ für den Abbau der Proteine verantwortlich ist (Glutzer, *et al.*, 1991; Klotzbücher, *et al.*, 1996; Rogers, *et al.*, 1986) (s. 1.2.2.2.2).

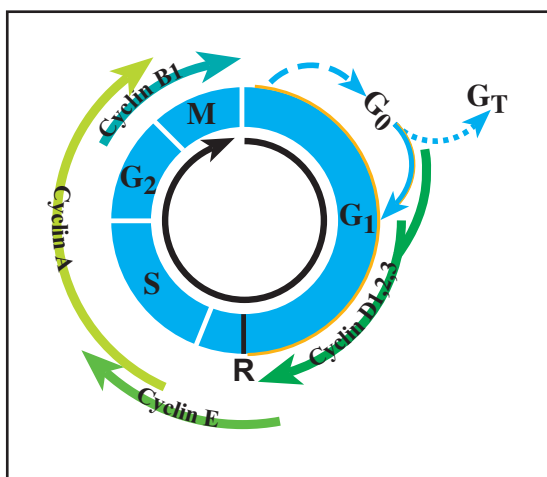


Abb. 3: Schematische Darstellung der Cyclin-Expression innerhalb des Zellzyklus.

Die grünen Pfeile symbolisieren die Dauer der Expression des jeweiligen Cyclins. Die einzelnen Phasen des Zellzyklus sind durch blaue Bereiche symbolisiert. Der orange markierte Teil der G_1 -Phase stellt den Zeitraum der möglichen mitogenen Einflußnahme dar. Die roten Pfeile stellen die einzelnen Kontrollpunkte (checkpoints) dar.

G_1 = erste Ruhephase, S = Synthesephase, G_2 = zweite Ruhephase, M = Mitose, G_0 = Dauerruhephase, G_T = terminales Differenzierungsstadium

In höheren Eukaryonten sind bislang mindestens elf verschiedene Klassen von Cyclinen (Cyclin A - T) (s. Tab. 1) identifiziert worden. Dabei treten Isoformen eines Proteins auf, die alle die gleiche Funktion ausüben, aber in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden, wie die Cycline D1, D2 und D3 (Sherr, 1993). Außerdem gibt es Cyclin-Isoformen, die in denselben Zellen koexprimiert werden, aber wahrscheinlich verschiedene Funktion haben, so z.B. die B-Typ Cycline. Weiterhin gibt es alternativ gespleißte Varianten, z.B. bei Cyclin E, von dem mindestens neun verschiedene Spleißvarianten beschrieben wurden, deren differentielle Funktionen und Eigenschaften noch nicht geklärt sind (Keyomarsi, *et al.*, 1995; Koff, *et al.*, 1991; Lew, *et al.*, 1991; Mumberg, *et al.*, 1997; Ohtsubo, *et al.*, 1995; Porter und Keyomarsi, 2000; Sewing, *et al.*, 1994).

Cyclin	katalytische Partner	inhibitorische Partner	Zellzyklus-Funktion in	Substrate	subzelluläre Expression
Cyclin A1			Meiose		nukleär
Cyclin A2	Cdk2, Cdk1, (Cdk3)	p21 ^{Cip1} , p27 ^{Kip1} , p57 ^{Kip2}	S-G ₂ -Phase		nukleär
Cyclin B1	Cdk1	p21 ^{Cip1} , p27 ^{Kip1}	G ₂ -M-Phase		zytoplasmatisch-nukleär
Cyclin B2					
Cyclin B3	Cdk1	p21 ^{Cip1}	G ₂ -M-Phase		nukleär
Cyclin C	Cdk8		G ₁ -Phase		nukleär
Cyclin D1	Cdk4, Cdk6, (Cdk2, Cdk5)	p15 ^{Ink4b} , p16 ^{Ink4a} , p18 ^{Ink4c} , p19 ^{Ink4d} , p21 ^{Cip1} , p27 ^{Kip1} , p57 ^{Kip2}	G ₁ -Phase	pRb	
Cyclin D2					
Cyclin D3					
Cyclin E	Cdk2, (Cdk3)	p21 ^{Cip1} , p27 ^{Kip1} , p57 ^{Kip2}	G ₁ -S-Phase	pRb, NPAT, NPM/B23...	nukleär
Cyclin E2	Cdk2, (Cdk3)	?	G ₁ -S-Phase		
Cyclin F	skp, Cul, Roc1	?	G ₂ -Phase	phosph. Cycline (z.B. Cyclin E)	nukleär
Cyclin G1	GAK, Cdk9		kontinuierlich		zytoplasmatisch
Cyclin G2			S-Phase		
Cyclin H	Cdk7		kontinuierlich	Cdks	
Cyclin I	?		kontinuierlich		zytoplasmatisch + nukleär
Cyclin K	Cdk9		-		
CyclinT1	Cdk9		-		
CyclinT2	?		-		

Tab. 1: Mitglieder der Cyclin-Proteinfamilie und ihre Eigenschaften am Beispiel der bislang bekannten humanen Cycline.

Im weiteren werden die bislang bekannten Cycline höherer Eukaryonten, die eine zellzyklusregulatorische Funktion besitzen, kurz beschrieben:

Die Expression von Cyclin A wird ab dem Beginn der S-Phase, positiv durch die Mitglieder der E2F-Familie von Transkriptionsfaktoren beeinflusst, mit einem Maximalniveau in der G₂-Phase, bis in die M-Phase hinein exprimiert. Es kann die Kinasen Cdk2 und Cdk1 aktivieren und wird in der Metaphase durch Ubiquitinierung gesteuert abgebaut (Elledge und Spottswood, 1991; Giordano, *et al.*, 1989; Pagano, *et al.*, 1992; Pines und Hunter, 1990; Tsai, *et al.*, 1991). Die genaue Funktion der beiden möglichen Komplexe ist noch unbekannt, obwohl man weiß, daß CyclinA/Cdk2 z.B. in den Abbau von E2F involviert ist (Dynlacht, *et al.*, 1994; Krek, *et al.*, 1994). Eine entscheidende Funktion spielt Cyclin A in der S-Phasen-Regulation und für den

Eintritt in die Mitose (Girard, *et al.*, 1991; Lehner und O'Farrell, 1990; Pagano, *et al.*, 1992; Resnitzky, *et al.*, 1995).

Die B-Typ Cycline (B1, B2 und B3) sind ausschließlich mitotische Cycline, die mit Cdk1 (=Cdc2) assoziieren und durch deren Aktivierung die Mitose induzieren (Pines und Hunter, 1989). Sie besitzen die „Destruction-Box“ als Proteinmotiv in ihrem N-Terminus und werden dadurch zur Degradation durch Ubiquitinierung determiniert (s. 1.2.2.2.2) (Glötzer, *et al.*, 1991). Weiterhin ist ihre Aktivität durch ihre Lokalisation reguliert, denn durch ein „zytoplasmatisches Retentionssignal“ (CRS) werden Cyclin B1 und B2 im Gegensatz z.B. zu den nukleären Cyclinen A und B3 im Zytoplasma zurückgehalten (Pines und Hunter, 1994). In diese Regulation ist auch Cyclin F durch direkte Interaktion mit B-Typ Cyclinen involviert (Bai, *et al.*, 1994; Kraus, *et al.*, 1994). Kurz vor der Prometaphase und dem Auflösen der Kernmembran werden diese B-Typ Cycline in den Kern transloziert um dort Cdk1 zu aktivieren und die Mitose weiter fortschreiten zu lassen (Gallant und Nigg, 1992; Jackman und Pines, 1997; Pines und Hunter, 1991). Die Funktionen von Cyclin B liegen in der Regulation des Mikrotubuli Netzwerkes, des Spindelapparates und der Zentrosomen, sowie des Zytoskeletts und des Golgi-Apparates während der Mitose (Jackman und Pines, 1997). Mit dem Ende der Mitose erfolgt der schnelle Abbau der B-Typ Cycline nach Ubiquitinierung durch den APC/Cyclosom-Komplex (Page und Hieter, 1997) (s. 1.2.3).

Die Cycline des D-Typs (D1, D2 und D3) werden hauptsächlich in der G₁-Phase exprimiert, allerdings wird ihre Proteinmenge im Verlauf des gesamten Zellzyklus weniger stark reguliert, als die der anderen zellzyklusregulatorischen Cycline. D-Typ Cycline weisen eine zell- und gewebespezifische Expression der drei Subtypen auf (Sherr, 1993). Dabei ist eine Redundanz gegeben (s.o.) und es wird angenommen, daß jede Zelle mindestens eines der D-Typ Cycline exprimiert. Zunächst wurde das *Cyclin D1*-Gen entdeckt, das in B-Zell-Lymphomen transloziert und dadurch transkriptionell aktiviert wird (daher auch der Name Bcl-1: B-cell-Lymphoma Gen 1) (Motokura, *et al.*, 1991). Später wurde in anderen Experimenten die Bedeutung der D-Typ-Cycline als Zellzyklusregulatoren in der G₁-Phase-Progression deutlich (Baldin, *et al.*, 1993; Lew, *et al.*, 1991; Matsushime, *et al.*, 1991; Quelle, *et al.*, 1993; Xiong, *et al.*, 1991). D-Typ Cycline binden und aktivieren die beiden nahe verwandten Kinasen Cdk4 und Cdk6 (Matsushime, *et al.*, 1992; Meyerson und Harlow, 1994). Die Expression der D-Typ Cycline wird durch mitogene extrazelluläre Signale, die über die Signaltransduktions-maschinerie des Ras-Signalweges weitergeleitet werden, z.B. CSF (engl.: colony stimulating factor) oder EGF (engl.: epithelial growth factor), reguliert, wodurch zumindest Cyclin D1 als Sensor für Wachstumssignale fungiert (Herber, *et al.*, 1994; Matsushime, *et al.*, 1991; Roussel, 1998; Sherr, 1993). Die Menge des Cyclin D1-Proteins und die Aktivität des Cyclin D/Cdk4/6-Holoenzym stellt also in der G₁-Phase eine direkte Antwort auf extrazelluläre Stimuli dar (Roussel, 1998). Die Cyclin D-Kinasekomplexe phosphorylieren als wichtigstes Substrat das pRb-Protein (s. 1.2.3) und tragen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F bei, welcher

wiederum Zielgene aktiviert, deren Produkte zum Fortschritt des Zellzyklus beitragen (Weinberg, 1995). Ein solches indirektes Zielgen von Cyclin D1 ist nach neueren Untersuchungen das *Cyclin E*-Gen (Geng, *et al.*, 1999). Weiterhin hat Cyclin D1 Funktionen in der Entwicklung des Zentralnervensystems, der Retina und des Mammaepithels in der Laktation, was bei gendefizienten Mäusen zusammen mit generell verringertem Wachstum und einer erhöhten frühen Letalität beobachtet wurde (Fantl, *et al.*, 1995; Sicinski, *et al.*, 1995).

Die E-Typ-Cycline (E und E2) werden von der späten G₁-Phase bis gegen Ende der S-Phase exprimiert und regulieren den Restriktionspunkt sowie den Eintritt der Zelle in die S-Phase. Ebenso wie für Cyclin D1 konnte gezeigt werden, daß Cyclin E limitierend für das Durchlaufen der G₁-Phase und den Eintritt in die S-Phase ist (Jackson, *et al.*, 1995; Ohtsubo, *et al.*, 1995; Rempel, *et al.*, 1995). Die Expression von *Cyclin E* wird durch E2F reguliert (DeGregori, *et al.*, 1995; Duronio und O'Farrell, 1995; Geng, *et al.*, 1996; Ohtani, *et al.*, 1995). Cyclin E bindet und aktiviert Cdk2 und übt, durch die Phosphorylierung seiner Substrate und die daraus folgende Genaktivierung, eine S-Phase initiiierende Funktion aus (Dulic, *et al.*, 1992; Koff, *et al.*, 1992). Außerdem gibt es Hinweise auf eine Funktion von Cyclin E im Zentrosomenzyklus, in der Kontrolle der genetischen Stabilität und in der direkten Initiation der DNA-Replikation (Hinchcliffe, *et al.*, 1999; Krude, *et al.*, 1997; Mussman, *et al.*, 2000; Okuda, *et al.*, 2000; Spruck, *et al.*, 1999). Das kürzlich beschriebene zweite Mitglied der Cyclin E-Familie Cyclin E2 weist zwar ein ähnliches zeitliches Expressionsmuster im Zellzyklus auf wie Cyclin E und teilt einige seiner Eigenschaften, jedoch bleibt nachzuweisen welche seiner Funktionen mit letzterem übereinstimmen (Gudas, *et al.*, 1999; Lauper, *et al.*, 1998; Zariwala, *et al.*, 1998). Für Cyclin E/Cdk2 sind verschiedene mögliche Substrate beschrieben worden, doch fehlt neben pRb, b-Myb, NPAT etc., weiterhin ein Cyclin E-spezifisches, für den Zellzyklus wichtiges Substrat (s. 1.2.3).

Die für den Zellzyklus bedeutende Funktion des Cyclin H liegt in der Aktivierung des Cdk7 Holoenzym, und damit in der Bildung der Cdk aktivierenden Kinase (CAK) (Fisher und Morgan, 1994; Mäkelä, *et al.*, 1994; Tassan, *et al.*, 1994) (s. 1.2.1.2). Als Substrate dieses Kinasekomplexes dienen andere Cyclin abhängige Kinasen, die durch die Phosphorylierung aktiviert werden.

Interessanterweise gibt es auch virale Cycline, die in den Zellzyklus von infizierten Zellen eingreifen und diesen stören, um dem Virus Gelegenheit zur Replikation zu geben (Chang, *et al.*, 1996; Ellis, *et al.*, 1999; Mann, *et al.*, 1999).

Im Gegensatz zu Hefen, bei denen verschiedene Cycline immer die gleiche Kinase aktivieren, binden in höheren Eukaryonten unterschiedliche Cycline an verschiedene Kinasen, wobei es Überschneidungen gibt. So bindet Cyclin A sowohl Cdk2 als auch Cdk1 (=Cdc2) und aktiviert beide, jedoch konnten bislang keine unterschiedlichen Funktionen dieser beiden Komplexe in der S- oder G₂-M-Phase gezeigt werden. Da jedoch die humanen Cycline D1, E und A in

Cyclin-defizienten Hefen die Funktion der fehlenden Hefe-Cycline übernehmen können, ist anzunehmen, daß sie funktionell redundant sind bzw. ihre Funktion evolutionär konserviert ist (Koff, *et al.*, 1991; Lew, *et al.*, 1991). Eine funktionelle Redundanz der Cycline ist auch an den geringen Fehlentwicklungen der Cyclin D1 defizienten Mäuse zu erkennen (Fantl, *et al.*, 1995; Sicinski, *et al.*, 1995). Die Aufhebung des *Cyclin D1*^{-/-}-Phänotyps durch Cyclin E deutet ebenfalls auf funktionelle Redundanz hin (Geng, *et al.*, 1999). Zusammen mit Versuchen zur Aufklärung der differentiellen pRB-Phosphorylierung legen diese Befunde zwei verschiedene Mechanismen für die Beschleunigung der G₁-Phase durch die beiden Proteine und eine von Cyclin D1 abhängige Cyclin E-Funktion nahe (Ohtsubo, *et al.*, 1995; Resnitzky und Reed, 1995).

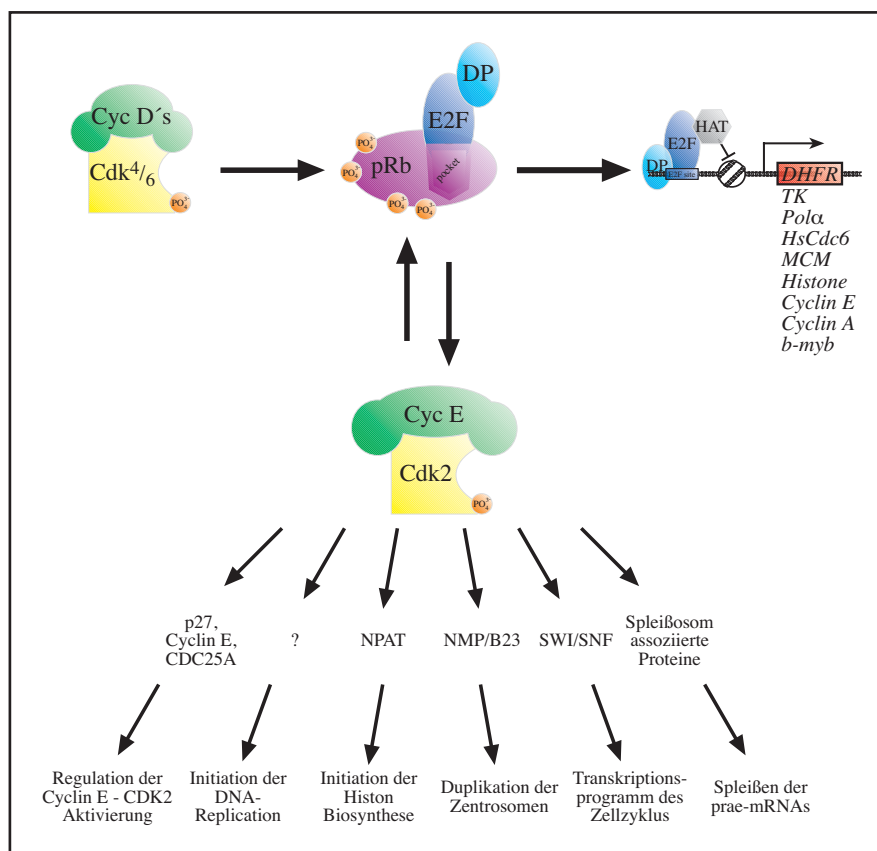


Abb. 4: Schema der Cyclin E-Funktionen

Zusammenfassung der bekannten Funktionen von Cyclin E. Angegeben sind die publizierten Zielgene und Substrate von Cyclin E/Cdk2 und ihre Wirkung.

1.2.1.2 Cyclin abhängige Kinasen (Cdks)

(Morgan, 1997)

Im Gegensatz zu den Cyclinen ist die Expression ihrer Partnerproteine, der Cdks, im Verlaufe des Zellzyklus konstant. Sie sind sowohl die eigentlichen Motoren des Zellzyklus als auch gleichzeitig diejenigen Elemente, über die der Ablauf des Zellzyklus zeitlich und durch Integration von äußeren Signalen gesteuert wird. Bislang konnten in höheren Eukaryonten neun verschiedene Cdks (Cdk1-9) identifiziert werden (s. Tab. 1), während Hefen mit nur je einem solchen Protein auskommen. Nicht alle Cdks haben eine zellzyklusregulatorische Funktion und es konnte bisher nicht jeder Cdk zweifelsfrei ein oder mehrere aktivierende Cyclin-Partner zugeordnet werden. Bei den Cyclin abhängigen Kinasen handelt es sich um eine Familie

strukturell nahe verwandter und evolutionär hoch konservierter Serin/Threonin-Kinasen, deren Prototypen die beiden Hefeproteine cdc2 und Cdc28 aus *S. pombe* bzw. *S. cerevisiae* sind (Reed, *et al.*, 1985; Simanis und Nurse, 1986). Alle Cdks haben ein Molekulargewicht von ca. 33 kDa und weisen eine basale Proteinkinasestruktur auf, die aus einer β -Faltblatt-reichen amino-terminalen Domäne und einer hauptsächlich α -helikalen carboxy-terminalen Domäne besteht, wobei das aktive Zentrum des Enzyms zwischen diesen beiden Domänen liegt (Endicott, *et al.*, 1999; Pavletich, 1999) (s. Abb. 5). Neben typischen Motiven für ATP-abhängige Kinasen, z.B. dem Phosphat-Anker (oder auch G-x-G-x-x-G-Motiv), ähneln sich die Cdks in weiteren Motiven, so z.B. in dem für die Cyclin-Bindung wichtigen „PSTAIRES“-Motiv innerhalb einer α -Helix, das zunächst auch die Namen für diese Kinasen ergab (z.B. PLSTIRE für Cdk6) (Eckstein, 1995). Die Aktivität der Kinasen unterliegt neben der Aktivierung durch die Cycline (s. 1.2.2.2) einer sehr komplexen Regulierung durch aktivierende und deaktivierende Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen, sowie der Bindung von inhibitorischen Proteinen (s. 1.2.2.4 & 1.2.2.1, s. Abb. 6), was sie zu den am stärksten differenziell regulierten Kinasen macht und ihre zentrale Bedeutung innerhalb der Proliferationsregulation widerspiegelt. Die für die Regulation der Zellzyklusprogression wichtigsten Kinasen Cdk1 und Cdk2 können von den übrigen Mitgliedern der Familie durch ihre funktionelle Homologie zu den Hefeproteinen cdc2 und Cdc28, sowie durch ihre Substratspezifität unterschieden werden. Die Mitglieder der Cdk-Proteinfamilie, die unterschiedliche Funktionen innerhalb des Zellzyklus besitzen, werden hier im Folgenden kurz beschrieben:

Die eukaryontische Kinase Cdk1 (Cdc2) initiiert die Mitose, wenn sie durch Bindung an Cycline des B-Typs und durch Phosphorylierung aktiviert wurde (Draetta, *et al.*, 1987; Dunphy, *et al.*, 1988; Gautier, *et al.*, 1988; Giordano, *et al.*, 1989; Lee, *et al.*, 1988; Lee und Nurse, 1987; Pines und Hunter, 1989; Simanis und Nurse, 1986; Solomon, *et al.*, 1992). Dieser Kinasekomplex, auch als sogenannter „mitosis promoting factor“ (MPF) bekannt, hat große Bedeutung in der Regulation des eukaryontischen Zellzyklus und ist essentiell für den Eintritt in die Mitose (Gautier, *et al.*, 1990; Maller, 1991; Nurse, 1990; Riabowol, *et al.*, 1989). Weiterhin wurde nachgewiesen, daß auch Cyclin A Cdk1 binden und aktivieren kann, und ebenfalls eine Bedeutung für den Eintritt in die Mitose hat (Giordano, *et al.*, 1989; Pagano, *et al.*, 1992).

Die ebenso wie Cdk1 zu den Histon H1-kinasierenden Mitgliedern der Cdk-Familie gehörende Cdk2 bindet ihre regulatorischen Partner Cyclin E und Cyclin A in der späten G₁- bis S-Phase bzw. in der S- und G₂-Phase (Elledge und Spottswood, 1991; Ninomiya-Tsuji, *et al.*, 1991; Tsai, *et al.*, 1991). Dabei kontrolliert sie sowohl den Restriktionspunkt, als auch den Verlauf der S-Phase und ist in weitere Vorgänge des Zellzyklus, z.B. den Zentrosomenzyklus, involviert. *In vitro* konnte nachgewiesen werden, daß Cyclin E2 an Cdk2 binden und diese aktivieren kann (Gudas, *et al.*, 1999; Lauper, *et al.*, 1998; Zariwala, *et al.*, 1998). Die Analyse der Kristallstrukturen von Cdk2, seiner Aktivierung durch Phosphorylierung und Cyclin A-Bindung, sowie der Inhibition durch p27^{Kip1} tragen entscheidend zum Verständnis der Molekülfunktionen

und -interaktionen bei (De Bondt, *et al.*, 1993; Jeffrey, *et al.*, 1995; Russo, *et al.*, 1996a; Russo, *et al.*, 1996b) (s. Abb. 5). Als Substrate für Cdk2/Cyclin E sind bislang nur wenige, für die Zellzyklusregulation wichtige Proteine als Kandidaten identifiziert worden. So ist inzwischen das Retinoblastoma-Protein (pRb) als Substrat nicht nur von Cdk4/6/Cyclin D1/2/3, sondern auch von Cdk2/Cyclin E anerkannt. Weitere Substrate von Cdk2/Cyclin E, die ebenfalls als transkriptionelle Regulatoren wirken, sind z.B. NPAT oder b-Myb, das auch von Cdk2/Cyclin A durch Phosphorylierung aktiviert wird (Sala, *et al.*, 1997; Saville und Watson, 1998; Zhao, *et al.*, 1998). Außerdem ist eine Interaktion von Cyclin E/Cdk2 mit Faktoren der prä-mRNA-Spleißmaschinerie beschrieben worden (Seghezzi, *et al.*, 1998).

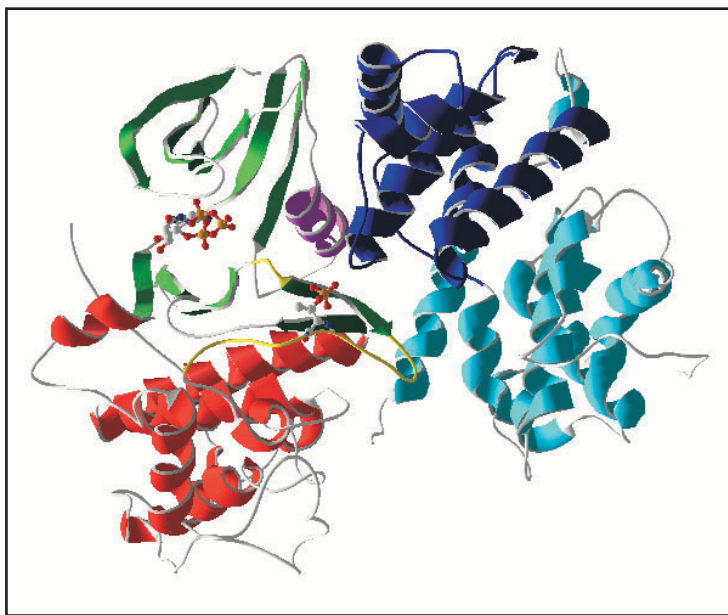


Abb. 5: Schematische Darstellung der Kristallstruktur von Cdk2 gebunden an Cyclin A.

grün: β -Faltblätter von Cdk2
gelb: „T-loop“ von Cdk2
magenta: „PSTAIR“-Helix von Cdk2
dunkelblau: α -Helices der „Cyclin-Box“ von Cyclin A
hellblau: α -Helices von Cyclin A
als Kugel-Stab-Modell: ATP, Thr160 im „T-loop“ von Cdk2
(nach Daten von Russo, *et al.*, 1996b).

Ursprünglich als Verwandte des humanen Cdk1 identifiziert ist inzwischen bekannt, daß Cdk4 und Cdk6 die wichtigsten katalytischen Partner der D-Typ Cycline sind (Bates, *et al.*, 1994; Hanks, 1987; Matsushime, *et al.*, 1992; Meyerson, *et al.*, 1992; Meyerson und Harlow, 1994; Xiong, *et al.*, 1992). Im Gegensatz zu den Cyclin abhängigen Kinasen 1, 2, 3 und 5, sind Cdk4 und Cdk6 nicht in der Lage das Protein Histon H1 zu phosphorylieren und weisen auch eine unterschiedliche Substratspezifität auf, was sich auch an der fehlenden Komplementation einer Cdc28-Mutation in *S. cerevisiae* ablesen läßt (Matsushime, *et al.*, 1992; Meyerson, *et al.*, 1992). Das Substrat von Cdk4 und Cdk6 ist das Tumorsuppressorprotein pRb (s. 1.2.3), über dessen Phosphorylierung sie die Aktivität der E2F-Proteine kontrollieren. Während das Cdk4-Protein ubiquitär zu finden ist, wird Cdk6 spezifisch in Lymphozyten exprimiert (Matsushime, *et al.*, 1994; Meyerson und Harlow, 1994; Tam, *et al.*, 1994).

Zusammen mit Cyclin H und Mat1 bildet Cdk7 (auch MO15 genannt) die Cdk aktivierende Kinase (CAK) (Fesquet, *et al.*, 1993; Poon, *et al.*, 1993; Solomon, *et al.*, 1993). Dieses Holoenzym phosphoryliert einige andere Cdks an bestimmten Threonin-Resten innerhalb des sog. „T-loops“ und aktiviert sie dadurch (Nigg, 1996). Cdk7 selbst wird wiederum von Cdk1 und Cdk2 aktivierend phosphoryliert (Garrett, *et al.*, 2001). Außerdem hat Cdk7 die Funktion in

Assoziation mit TFIID die C-terminale Domäne (CTD) der RNA Polymerase II zu phosphorylieren und eventuell weitere Aufgaben während der DNA Reparatur (Drapkin, *et al.*, 1996; Svejstrup, *et al.*, 1996). Dadurch bildet Cdk7 ein verbindendes Glied zwischen Zellzyklusregulation und Transkription. Wegen dieser verschiedenen Funktionen erscheint es plausibel, daß die basale Aktivität der CAK über den gesamten Zyklus hinweg nicht limitiert ist, aber durch eine positive Rückkopplungsschleife von Cdk1 und Cdk2 durch Phosphorylierung aktiviert wird (Garrett, *et al.*, 2001; Nigg, 1996). Das antagonistische Enzym der CAK ist die Phosphatase KAP (Cdk assoziierte Phosphatase) (Poon und Hunter, 1995).

1.2.2 Regulation von Kinasen, die den Zellzyklus steuern

(Morgan, 1995; Morgan, 1997)

Die Steuerung der zuvor beschriebenen Kinasen unterliegt nicht nur der Aktivierung durch das Vorhandensein oder Fehlen ihrer regulatorischen Cyclin Untereinheiten, sondern noch einer Vielzahl anderer Mechanismen, die direkt oder indirekt Einfluß auf die Aktivität der Cyclin/Cdk-Komplexe nehmen (s. Abb. 6). Dabei sind sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre Signalwege und Enzymkaskaden an der Steuerung beteiligt, die z.B. die Inhibitoren der Cdks (CKIs, engl.: cyclin dependent kinase inhibitor) beeinflussen oder durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung die Aktivität der Kinase modulieren.

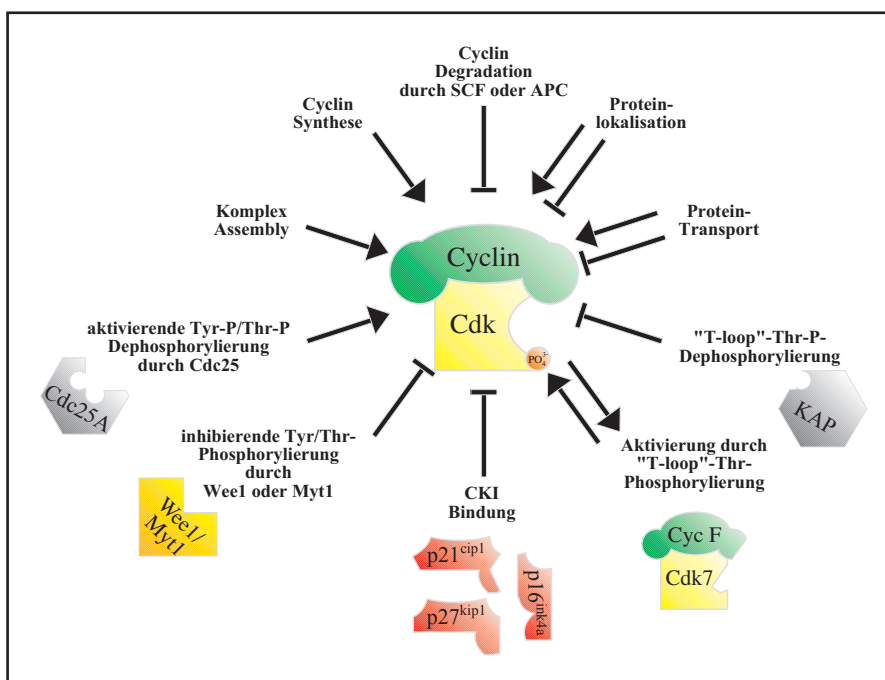


Abb. 6: Schema der Regulationsvorgänge, durch die Cyclin abhängige Kinasen gesteuert werden.

(modifiziert nach Garrett und Fattaey, 1999). Gezeigt sind die Vorgänge die die Aktivität der Cdks beeinflussen und die dazugehörigen Proteine.

1.2.2.1 Inhibitoren von zellzyklussteuernden Kinasen

(Harper, 1997; Sherr und Roberts, 1999)

Die Proteine, die die Aktivität der Cdk's durch direkte Bindung negativ beeinflussen, lassen sich auf Grund ihrer Strukturen und Wirkungsspezifitäten in zwei Familien unterteilen: Ink4 und Cip/Kip.

1.2.2.1.1 Inhibitoren der Ink4-Familie

(Ruas und Peters, 1998)

Die Mitglieder dieser Proteinfamilie inhibieren die Kinase Cdk4, woher auch der Name Ink4, Inhibitor der Cyclin abhängigen Kinase 4 stammt (Ink4, engl.: inhibitors of Cdk4). Es sind vier Mitglieder dieser Familie bekannt, $p16^{Ink4a}$, $p15^{Ink4b}$, $p18^{Ink4c}$ und $p19^{Ink4d}$, die gewebespezifisch exprimiert werden (Chan, *et al.*, 1995; Guan, *et al.*, 1994; Guan, *et al.*, 1996; Hannon und Beach, 1994; Hirai, *et al.*, 1995; Serrano, *et al.*, 1993). Jedes dieser vier Proteine weist mehrere „Ankyrin Repeats“ (Bork, 1993) als charakteristisches Proteinmotiv auf und ist in der Lage die Kinasen Cdk4 und Cdk6 durch direkte Bindung spezifisch zu hemmen. Dadurch wird die Phosphorylierung von pRb blockiert und ein G_1 -Arrest ausgelöst (Koh, *et al.*, 1995; Lukas, *et al.*, 1995). Diese Verschaltung wird als „Rb-Signalweg“ bezeichnet und besteht aus der Interaktion von $p16^{Ink4a}$ /Cyclin D/Cdk4/6/pRb. Ink4-Proteine können nur die nicht an Cyclin gebundenen Kinasen Cdk4 bzw. Cdk6 inhibieren. Bislang gibt es Belege und Modelle, die eine Interaktion mit Cyclin D1 bzw. einen ternären Komplex mit Cdk und Cyclin ausschließen (Koh, *et al.*, 1995; Lukas, *et al.*, 1995; Parry, *et al.*, 1999).

Die Regulation der Expression der *Ink4*-Gene ist bislang noch weitgehend unklar, allerdings weiß man, daß $p16^{Ink4a}$ mit zunehmendem Alter der Zelle akkumuliert und möglicherweise als Alterssensor fungiert (Alcorta, *et al.*, 1996; Hara, *et al.*, 1996; Palmero, *et al.*, 1997; Serrano, *et al.*, 1997; Zindy, *et al.*, 1997a). Eine weitere interessante Eigenschaft des $p16^{Ink4a}$ -Gens ist, daß es einen zweiten alternativen Leserahmen und einen zweiten Promotor beinhaltet, der für das p53-aktivierende $p14^{ARF}$ -Protein kodiert, dessen Transkription durch E2F aktiviert wird und so pRb und p53 miteinander verbindet (James und Peters, 2000; Quelle, *et al.*, 1995; Sharpless und DePinho, 1999; Sherr und Weber, 2000). Die Expression von $p15^{Ink4b}$ wird durch das Zytokin TGF- β (engl.: transforming growth factor β) induziert und vermittelt dadurch einen G_1 -Arrest (Hannon und Beach, 1994; Ravitz und Wenner, 1997; Reynisdottir und Massague, 1997; Reynisdottir, *et al.*, 1995). Sowohl $p18^{Ink4c}$, als auch $p19^{Ink4d}$ werden in der embryonalen Entwicklung exprimiert und können eine Rolle in der terminalen Differenzierung spielen (Morse, *et al.*, 1997; Phelps, *et al.*, 1998; Zindy, *et al.*, 1997b).

Die Kristallstrukturen von $p16^{Ink4a}$ und $p19^{Ink4d}$ gebunden an Cdk6, sowie von $p18^{Ink4c}$ und $p19^{Ink4d}$ geben Auskunft über ihre Wirkungs- bzw. Bindungsweise (Baumgartner, *et al.*, 1998; Brotherton, *et al.*, 1998; Russo, *et al.*, 1998; Venkataramani, *et al.*, 1998). Die Bindung von $p16^{Ink4a}$ oder $p19^{Ink4d}$ an Cdk6 bewirkt bzw. blockiert strukturelle Änderungen der Kinase und behindert die ATP-Bindung. $p16^{Ink4a}$ bzw. $p19^{Ink4d}$ werden durch eine Reihe von Ionenbindungen an Cdk6 gebunden, wobei die Cyclin-Bindung nicht inhibiert wird, so daß ein

ternärer Komplex aus Ink4-Protein und Cdk/Cyclin entgegen der bisherigen Auffassung (s.o.) möglich wäre. Da einige der konservierten, geladenen Aminosäuren nur in Cdk4 und Cdk6 vorkommen, erklärt dies die hochspezifische Bindung der Ink4-Proteine ausschließlich an diese beiden Kinasen. Weiterhin konnte so geklärt werden, daß die bislang gefundenen Punktmutationen in Cdk4 und p16^{Ink4a}, die an spontanen und familiären Formen von Hautkrebs beteiligt sind (Soufir, *et al.*, 1998; Tsao, *et al.*, 1998; Wölfel, *et al.*, 1995; Zuo, *et al.*, 1996), an Stellen liegen, die für die Interaktion der Proteine notwendig sind und diese stören.

1.2.2.1.2 Proteine der Cip/Kip-Familie

(Hengst und Reed, 1998; Nakayama, 1998; Sherr und Roberts, 1995)

Bislang sind drei Mitglieder der Cip/Kip-Familie bekannt: p21^{Cip1} (auch Waf1 oder Sdi1 genannt), p27^{Kip1} und p57^{Kip2} (El-Deiry, *et al.*, 1993; Gu, *et al.*, 1993; Harper, *et al.*, 1993; Lee, *et al.*, 1995; Matsuoka, *et al.*, 1995; Noda, *et al.*, 1994; Polyak, *et al.*, 1994a; Polyak, *et al.*, 1994b; Toyoshima und Hunter, 1994; Xiong, *et al.*, 1993a). Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Mitgliedern der Ink4-Familie haben die Proteine der Cip/Kip-Familie ein breiteres Spektrum an Partnerproteinen, die sie binden und inhibieren können. So binden sie an die meisten Cdks, auch im Komplex mit Cyclinen und inhibieren deren Aktivität, was sie teilweise durch eine Blockierung sowohl der ATP-Bindung und als auch der Aktivierung durch CAK erreichen (Kato, *et al.*, 1994; Polyak, *et al.*, 1994b; Russo, *et al.*, 1996a). Dies wird durch die stark konservierte N-terminale ca. 60 Aminosäuren große Domäne der Cip/Kip-Proteine vermittelt (Harper, *et al.*, 1995; Lin, *et al.*, 1996; Luo, *et al.*, 1995; Nakanishi, *et al.*, 1995). Weitere Bindungseigenschaften dieser inhibitorischen Proteine werden durch eine zweite Domäne vermittelt (s. u.), weshalb sie auch als Inhibitoren mit zweifacher Spezifität bezeichnet werden (Harper und Elledge, 1996). Alle Mitglieder der Proteinfamilie bewirken bei ausreichender Expression durch die Inhibition der gebundenen Cdks einen G₁-Arrest. Die Cip/Kip-Proteine weisen Unterschiede in ihrem Expressionsmuster auf, was eine redundante, gewebeabhängige Funktion als möglich erscheinen läßt (El-Deiry, *et al.*, 1995; Harper und Elledge, 1996; Matsuoka, *et al.*, 1995; Parker, *et al.*, 1995b). Jedoch sind viele Eigenschaften jeweils nur einem der drei bislang bekannten Proteine der Familie zuzuordnen, was wiederum gegen eine komplette Äquivalenz der Proteinfunktionen spricht.

Ebenfalls unterschiedlich sind die Regulationsmechanismen der drei Gene: Die Expression von p21^{Cip1} wird hauptsächlich transkriptionell durch das p53-Protein reguliert. Dieser Mechanismus hat eine entscheidende Funktion in der Zellzyklus-Arrest-Antwort nach DNA-Schädigung und in der Apoptoseinduktion (Dulic, *et al.*, 1994; El-Deiry, *et al.*, 1994; Li, *et al.*, 1994). Erstaunlicherweise wird die p21^{Cip1}-Expression auch durch mitogene Signale induziert, was seiner alleinigen Funktion als Proliferationsinhibitor widerspricht (Firpo, *et al.*, 1994; Li, *et al.*, 1994; Noda, *et al.*, 1994; Nourse, *et al.*, 1994). Weiterhin findet man eine Regulation des p21^{Cip1}-Genes während der terminalen Differenzierung, z.B. wird es durch Vitamin D oder in Muskelzellen durch MyoD induziert (Halevy, *et al.*, 1995; Liu, *et al.*, 1996; Parker, *et al.*, 1995b). Tatsächlich konnte für p21^{Cip1} eine Differenzierung auslösende Funktion in

Muskelzellen nachgewiesen werden (Rao, *et al.*, 1994; Skapek, *et al.*, 1995). Im Widerspruch dazu weisen $p21^{Cip1}$ -defiziente Mäuse keine Defekte in der Muskelausbildung auf, was einen redundanten Faktor erwarten läßt (Deng, *et al.*, 1995).

Während Wachstumsfaktoren den Eintritt in den Zellzyklus und damit die Abnahme der $p27^{Kip1}$ -Expression bewirken, wird beim Verlassen des Zellzyklus die Expression von $p27^{Kip1}$ durch antimitogene Signale, Kontaktinhibition oder Entzug von mitogenen Signalen positiv beeinflusst (Coats, *et al.*, 1996; Hengst, *et al.*, 1994; Hengst und Reed, 1996; Kato, *et al.*, 1994; Nourse, *et al.*, 1994; Poon, *et al.*, 1995; Winston, *et al.*, 1996). Allerdings ist die Regulation von $p27^{Kip1}$ hauptsächlich posttranslational, da innerhalb des Zellzyklus keine transkriptionelle Veränderung der Expression von $p27^{Kip1}$ -mRNA vorliegt (Hengst und Reed, 1996). So wird $p27^{Kip1}$ nach Phosphorylierung der Aminosäure Thr187 durch Cdk2/Cylin E und folgender Ubiquitinierung durch E2- und E3-Enzyme der Ubiquitin-konjugierenden Enzyme bzw. Ubiquitin-Ligasen über den Proteasom-Weg abgebaut (Pagano, *et al.*, 1995; Sheaff, *et al.*, 1997; Vlach, *et al.*, 1997) (s. 1.2.2.2.2). Dies erklärt die Akkumulation des $p27^{Kip1}$ -Proteins während der G_0 -Phase und das fluktuierende, zur Cdk2-Aktivität reziproke Vorhandensein während des Zellzyklus (Hengst und Reed, 1996; Pagano, *et al.*, 1995).

Neben der Vermittlung des G_1 -Arrests durch Inhibierung der Cyclin/Cdk-Komplexe wirkt $p57^{Kip2}$, ähnlich wie $p21^{Cip1}$, an Differenzierungsprozessen mit. Die Eigenschaften von $p57^{Kip2}$ liegen, neben seiner Fähigkeit Cdk-Cyclin-Komplexe zu binden und G_1 -Arrest zu induzieren, im Abbau nach Ubiquitinierung und in der Induktion von Differenzierungsprozessen (Lee, *et al.*, 1995; Matsuoka, *et al.*, 1995; Urano, *et al.*, 1999). Im Muskel z.B. stabilisiert $p57^{Kip2}$ den spezifischen Transkriptionsfaktors MyoD, während es auch für die Differenzierung von Nervenzellen und in der Augenentwicklung wichtig ist (Dyer und Cepko, 2000; Dyer und Cepko, 2001; Lovicu und McAvoy, 1999; Reynaud, *et al.*, 2000; Reynaud, *et al.*, 1999; Takahashi, *et al.*, 2000; Tsugu, *et al.*, 2000; Zhang, *et al.*, 1998; Zhang, *et al.*, 1999).

Weitere biochemische Studien haben gezeigt, daß die beiden etwa gleich großen Domänen des Proteins $p21^{Cip1}$ für je eine Bindungsfunktion an Cyclin/Cdk-Komplex und an PCNA (engl.: proliferating cell nuclear antigen) verantwortlich sind (Goubin und Ducommun, 1995; Warbrick, *et al.*, 1995). Letztere ist von Bedeutung für das Verständnis der Regulation des S-Phase-Eintritts durch die entstehende Inhibition der DNA-Polymerase δ (Flores-Rozas, *et al.*, 1994; Waga, *et al.*, 1994; Xiong, *et al.*, 1993b). Durch Überexpression können beide Hälften des Proteins für sich alleine eine Inhibition der DNA-Synthese hervorrufen, was zeigt, daß sowohl die Cdk-Inhibition, als auch die Bindung von PCNA wichtige Funktionen in der Zellzykluskontrolle durch $p21^{Cip1}$ darstellen (Luo, *et al.*, 1995). Im Gegensatz zu $p21^{Cip1}$ können $p27^{Kip1}$ und $p57^{Kip2}$ auf Grund einer unterschiedlichen zweiten Domäne nicht mit PCNA interagieren, weisen aber untereinander Homologien in einer QT genannten Domäne auf, die möglicherweise für andere Interaktionen verantwortlich ist (Matsuoka, *et al.*, 1995).

Es ist erstaunlich, daß Cyclin/Cdk-Komplexe, die Cip/Kip-Proteine beinhalten, trotzdem katalytisch aktiv sein können (Blain, *et al.*, 1997; Cheng, *et al.*, 1999; LaBaer, *et al.*, 1997; Soos, *et al.*, 1996; Xiong, *et al.*, 1992; Zhang, *et al.*, 1993). Dazu kommt, daß die Cip/Kip-Proteine eine

unterschiedliche Effektivität bei der Inhibition verschiedener Cyclin/Cdk-Komplexe (Cdk2 > Cdk4/6) haben. Ihre Funktion als Katalysatoren des Aufbaus (engl.: assembly factor) und des Transports von Cyclin/Cdk-Komplexen in den Kern, sowie als Aktivatoren der Cyclin/Cdk-Komplexe komplizieren das Bild der Funktionen dieser Proteine weiter (LaBaer, *et al.*, 1997). Allerdings ist die dabei bislang umstrittene Stöchiometrie der p21^{Cip1}/Cyclin/Cdk-Komplexe inzwischen gelöst und auf ein Verhältnis von 1 : 1 : 1 bestimmt worden (Adkins und Lumb, 2000).

Die Funktion von p21^{Cip1} bzw. p27^{Kip2} als „assembly factor“ wurde in Zellen aus den jeweiligen einzeln bzw. doppelt gendefizienten Mäusen weiter untersucht. Dies führte zu der Annahme, daß sowohl der Aufbau als auch die Lokalisation von Cyclin D/Cdk4/6-Komplexen und die Stabilität von Cyclin D-Proteinen von p21^{Cip1} bzw. p27^{Kip1} abhängig ist, da deren Vorkommen bzw. Aktivität in Geweben dieser Mäuse stark reduziert sind bzw. die Proteine im Zytoplasma verbleiben und/oder akkumulieren (Cheng, *et al.*, 1999).

Von Interesse ist das Zusammenspiel der Inhibitoren aus den Cip/Kip- und Ink4-Familien: So gibt es zunehmend Hinweise, daß durch die Expression von Ink4-Proteinen das Gleichgewicht von Cip/Kip-Inhibitoren, die an Cdk4/6 gebunden sind, zu Gunsten der Inhibition von Cdk2 durch Cip/Kip verschoben wird (McConnell, *et al.*, 1999; Parry, *et al.*, 1999; Ravitz und Wenner, 1997). Dieses Beispiel spiegelt das sensible Gleichgewichts zwischen den Faktoren der Zellzyklusregulation wider: Durch geringfügige Erhöhung oder Erniedrigung der Konzentration eines Regulators, sei es Cyclin, Kinase oder Inhibitor, kann sich der Zustand der aktiven oder inhibitierten Kinasekomplexe stark ändern (Sherr und Roberts, 1999).

1.2.2.2 Regulation der Cyclinverfügbarkeit

Eine weitere Regulationsebene der Aktivität von zellzyklusregulatorischen Kinasen stellen ihre Cyclin-Partner dar, deren Vorhandensein und Verfügbarkeit sowohl transkriptionell, als auch posttranslational gesteuert werden. Somit ergibt sich neben der Aktivierung von Cdks durch alleinige Cyclin-Bindung ein wesentlich komplexeres Bild der Cycline als Modulatoren, da sie selbst durch verschiedene Mechanismen stark reguliert werden.

1.2.2.2.1 Transkriptionelle Regulation der Cycline

Die Regulation soll am Beispiel von Cyclin D1 und Cyclin E verdeutlicht werden: Die Transkription des *Cyclin D1*-Gens wird durch Faktoren wie AP-1, Myc oder NF-κB aktiviert, was die Induzierbarkeit des Genes durch mitogene Signale (s. 1.2.1.1) erklärt, deren Endeffektoren die oben genannten Transkriptionsfaktoren darstellen (Albanese, *et al.*, 1995; Bakiri, *et al.*, 2000; Bouchard, *et al.*, 1999; Guttridge, *et al.*, 1999; Herber, *et al.*, 1994; Hinz, *et al.*, 1999; Perez-Roger, *et al.*, 1999). Jedoch wird das gleiche Gen durch einen veränderten AP-1-Komplex, der JunB statt c-Jun enthält, reprimiert (Bakiri, *et al.*, 2000).

Weiterhin können die verschiedenen Mitglieder der E2F-Proteinfamilie die Transkription der Cyclin E-mRNA sowohl aktivieren, als auch reprimieren (Dyson, 1998; Le Cam, *et al.*, 1999).

1.2.2.2.2 Posttranslationale Regulation der Cyclinstabilität

(Koepp, *et al.*, 1999; Murray, 1995; Winston, *et al.*, 1999; Zachariae und Nasmyth, 1999)

Neben der Regulation der Transkription von *Cyclin*-Genen trägt auch der Abbau der Cyclin-Proteine bzw. die Beeinflussung ihrer Stabilität durch posttranslationale Modifikationen zur Steuerung der Aktivität der Cdks und dadurch zur Regulation des Zellzyklus bei. Der Abbau der Cycline wird über zwei verschiedene, in der Evolution stark konservierte Wege bewerkstelligt, die beide in der Ubiquitinierung und der folgenden Zerstörung durch das Proteasom münden. Die G₁-Cycline werden über den SCF-Protein-Komplex (beinhaltet immer die Proteine Skp1, Cdc53/Cullin1 und Rbx1/ROC1, sowie ein variables F-box Protein, welches die Substratspezifität vermittelt) ubiquitiniert, während mitotische Cycline über den APC/C-Protein-Komplex (engl.: anaphase promoting complex, cyclosome) für den Abbau mit Ubiquitin-Molekülen markiert werden. Die beiden Proteinkomplexe fungieren als Spezifitätsfaktoren (E3), die für den Abbau markierte Substrate erkennen und binden. Weiterhin werden ein Ubiquitin aktivierendes Enzym (E1) und ein Ubiquitin konjugierendes Enzym (E2) benötigt und an die E3-Komplexe rekrutiert, um die Substratproteine mit den Polyubiquitinketten für den Abbau durch das 26S-Proteasom zu markieren (s. Abb. 8) (Hershko und Ciechanover, 1998).

Bei der Markierung der zu degradierenden Cycline spielen die zuvor erwähnten Motive „PEST-Box“ und „Destruction-Box“ (s.1.2.1.1) eine wichtige Rolle, denn die notwendigen Modifikationen finden innerhalb dieser Motive statt. Beispielsweise wird durch Cyclin E/Cdk2 an Thr380 „autophosphoryliertes“ Cyclin E für den Abbau über den SCF-Weg markiert (Clurman, *et al.*, 1996; Won und Reed, 1996). Nach der Phosphorylierung wird Cyclin E an das F-box-Protein p45^{skp2}, dessen Kristallstruktur ihm eine Positionierungsfunktion innerhalb des SCF-Komplexes zuweist, gebunden und dadurch an einen SCF-Komplex rekrutiert, nachfolgend ubiquitiniert und durch das Proteasom degradiert (s. Abb. 8) (Nakayama, *et al.*, 2000; Schulman, *et al.*, 2000; Sutterluty, *et al.*, 1999).

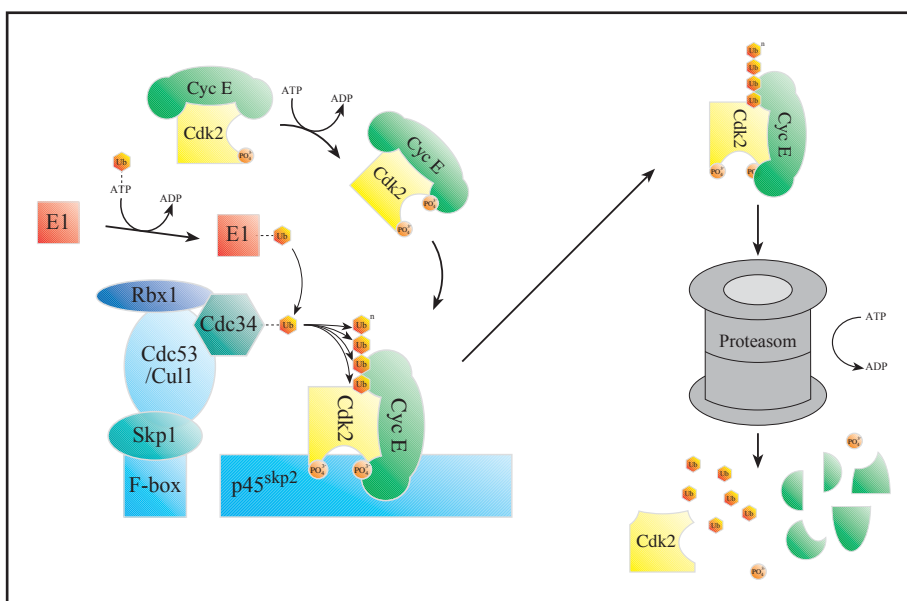


Abb. 8: Schema der Cyclin Degradation am Beispiel von Cyclin E

Nach Phosphorylierung von Cyclin E durch Cdk2/Cyclin E wird dieses durch p45^{skp2} an den SCF-Komplex rekrutiert. Dieser markiert Cyclin E durch Ubiquitinierung für den Abbau durch das Proteasom. Schematisch gezeigt sind die beteiligten Proteine und Enzymreaktionen (modifiziert nach Koepp, *et al.*, 1999).

Das zellzyklusabhängig in der späten G₁-Phase bis in die G₂-Phase exprimierte F-box-Protein p45^{skp2} bewirkt als Spezifitäts-Komponente neben dem Abbau von phosphoryliertem Cyclin E auch den Abbau anderer zellzyklusrelevanter Proteine wie p27^{Kip1}, E2F-1 und B-Myb (Carrano, *et al.*, 1999; Charrasse, *et al.*, 2000; Marti, *et al.*, 1999). Folglich unterliegt das hier als Beispiel herangezogene Cyclin E-Protein nicht nur einer transkriptionellen, sondern auch einer degradativen Kontrolle innerhalb der von ihm kontrollierten Zellzyklusphasen und darüber hinaus. Dies ist auch in der Embryonalentwicklung von großer Bedeutung, was die letalen Phänotypen verschiedener, für Teile des SCF-Komplexes gendefiziente, Mausstämme verdeutlichen (Dealy, *et al.*, 1999; Singer, *et al.*, 1999; Wang, *et al.*, 1999; Winston, *et al.*, 1999). Ähnlich wie Cyclin E oder p27^{Kip1} werden auch Cyclin D1 und p19^{Ink4d} über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut, wodurch ihre zellzyklusabhängige Expression mit reguliert wird (Diehl und Sherr, 1997; Thullberg, *et al.*, 2000). Ein weiteres Beispiel für die gegenseitige Steuerung von Regulatoren innerhalb des Zellzyklus ist, daß die Aktivität von Cyclin A/Cdk2 in der G₂-Phase notwendig ist, um den APC/C-Komplex zu inaktivieren und somit die Akkumulation von M-Phase-Cyclinen zu ermöglichen und den Beginn der Mitose einzuleiten (s. Abb. 7) (Lukas, *et al.*, 1999).

1.2.2.3 Subzelluläre Lokalisation von zellzyklusregulatorischen Proteinen

(Jackman und Pines, 1997)

Da viele der möglichen Substratproteine der Cdk/Cyclin-Komplexe, die die replikativen und transaktivierenden Vorgänge auf chromosomaler Ebene steuern, nukleäre Proteine sind, liegt die Hauptfunktion der Kinasekomplexe im Zellkern, wenn auch für einige Cyclin/Cdk-Komplexe zytoplasmatische Aufgaben diskutiert werden. Da vielen der an der Zellzyklusregulation beteiligten Proteine eine eigene Kernlokalisierungssequenz (NLS, engl.: nuclear localisation signal) fehlt, sind verschiedene Transportsysteme zu postulieren, die diese Proteine in den Kern translokieren. Eine weitere Stufe der Regulation von Cyclin abhängigen Kinasen liegt somit in ihrer eigenen Verteilung und der aktivierender bzw. reprimierender Proteine, sowie von Substratproteinen, innerhalb der verschiedenen Kompartimente der Zelle.

Am besten untersucht ist die Translokation von Cyclin B1/Cdk1 aus dem Zytoplasma in den Nukleus während des G₂-M-Übergangs und der Export des Komplexes aus dem Zellkern in das Zytoplasma während der Interphase (Takizawa und Morgan, 2000). Cyclin B1, das keine NLS besitzt, wird während der Interphase durch ein Retentionssignal in seiner Aminosäuresequenz und den nukleären Exportfaktor Crm1 im Zytoplasma konzentriert und nach seiner Phosphorylierung zu Beginn der Prophase vermehrt über Importin-β in den Kern transportiert um dort die Mitose zu initiieren (Moore, *et al.*, 1999; Yang, *et al.*, 1998).

Im Gegensatz zu Cyclin B1 wird z.B. Cyclin E immer im Zellkern gefunden; diese Lokalisation ist aber von einem Transportmechanismus mittels des Adapterproteins Importin-α über Importin-β abhängig. Eine ähnlich regulierte Lokalisation wurde kürzlich für Cyclin D1 gezeigt, dessen Aufenthalt im Kern von der eigenen Phosphorylierung durch GSK-3β, die auch für die

proteosomale Degradation verantwortlich ist, und dem Exportfaktor Crm1 zellzyklusabhängig reguliert wird (Alt, *et al.*, 2000; Diehl, *et al.*, 1998).

Weiterhin wird vermutet, daß fast alle Cdks, da sie keine eigene NLS besitzen, im Komplex mit ihren Cyclin Partnern auf noch zu klärendem Wege in den Kern gelangen und daß dieser Transport möglicherweise auch von weiteren Proteinen wie z.B. p21^{waf1} abhängig ist (Diehl und Sherr, 1997; Maridor, *et al.*, 1993; Pines und Hunter, 1994).

1.2.2.4 Regulation der Aktivität von Cdks durch den Phosphorylierungsstatus

(Morgan, 1997)

Cyclin abhängige Kinasen werden durch Phosphorylierung modifiziert und dadurch ihre Aktivität moduliert. Dabei spielen verschiedene Kinasen und Phosphatasen eine Rolle, deren Eigenschaften zunächst hauptsächlich im Hefesystem untersucht wurden und nun zunehmend auch in höheren Eukaryonten analysiert werden. Das wichtigste Enzym ist die Cdk aktivierende Kinase (CAK, s. 1.2.1.2), bestehend aus Cdk7, Cyclin H und Mat1 (Morgan, 1995). Dieser Enzymkomplex phosphoryliert einen konservierten Threonin-Rest innerhalb des sogenannten „T-loops“ (engl: T(hreonin)-Schleife) der Cdks, welcher für die Aktivierung des Enzyms von großer Bedeutung ist. Für die meisten zellzyklusrelevanten Cdks konnte eine Erhöhung der Aktivität durch „T-loop“-Aktivierung um das bis zu 300 fache gefunden werden. Auf molekularer Ebene bewirkt diese aktivierende Phosphorylierung einige kleinere Konformationsänderungen innerhalb der Cdks, da sich der äußerst bewegliche „T-loop“ so verwindet, daß neue Wasserstoffbrücken entstehen und eine bessere Substrat- und Cyclin-Bindung ermöglicht wird. Die Cdk assoziierte Phosphatase (KAP) hebt diese aktivierende Phosphorylierung wieder auf.

Eine weitere Regulation der Cdk-Aktivität erfolgt durch die Phosphorylierung zweier konservierter, N-terminaler, benachbarter Threonin- und Tyrosin-Reste (Thr14 und Tyr15 in Cdk1) durch die Enzyme Wee 1 und Myt 1 (Coleman und Dunphy, 1994; Lew und Kornbluth, 1996; Mueller, *et al.*, 1995b; Parker, *et al.*, 1995a). Diese Modifikationen sind nur im Cyclin-gebundenen Zustand möglich und inaktivieren den Enzymkomplex. Durch die Mitglieder der Cdc25-Familie von Phosphatasen können die inhibitorischen Phosphatreste wieder entfernt und das Holoenzym aktiviert werden. Interessanterweise wird auch die Aktivität und Lokalisation dieser drei Enzyme wiederum durch Phosphorylierung moduliert, welche durch Cdk/Cyclin-Komplexe bewerkstelligt wird, so daß eine positive Rückkopplungsschleife entsteht (Hoffmann, *et al.*, 1993; Mueller, *et al.*, 1995a). Zwar sind die meisten Untersuchungen zu diesen Regulationsvorgängen an der Cdk1/Cdc2-Kinase und der dadurch bedingten Mitose-Kontrolle durchgeführt worden, jedoch ergeben sich mehr und mehr Hinweise, daß auch die in die G₁-Kontrolle involvierten Cdks einem komplexen, von Phosphorylierung und Dephosphorylierung abhängigen, Regelmechanismus unterliegen (Iavarone und Massague, 1997; Jin, *et al.*, 1996; Terada, *et al.*, 1995).

1.2.3 Substrate der zellzyklusregulatorischen Kinasen

Die bislang am ausführlichsten charakterisierten Substrate der Cdks sind die Mitglieder der Familie des Retinoblastoma-Proteins (pRb), die auch als Pocketproteine bezeichnet werden. Dazu gehören pRb selbst sowie p107 und p130 (Lipinski und Jacks, 1999; Weinberg, 1995). Diese Proteine binden alle Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie und inhibieren diese dadurch. Es bildet sich ein Proteinkomplex der als transkriptioneller Repressor fungiert und in dem auch Histondeacetylasen (HDAC) und Histonacetylasen (HAT) (Kouzarides, 1999) zu finden sind (s. Abb. 7 & 9 und 1.2.2.2.1), die zur Regulation der Transkription beitragen (Ewen, 2000; Harbour und Dean, 2000a; Harbour und Dean, 2000b). Zunächst als Tumorsuppressorgen identifiziert (s. 1.3.1), wurde die Bedeutung des Retinoblastoma-Genprodukts als Substrat von Cdk4/6 erst später erkannt (Sherr, 1993; Sherr, 1994). Die zunehmende Phosphorylierung von pRb durch Cdk4/6/Cyclin D verhindert die inhibitorische Bindung von pRb an E2F. Freies E2F kann dann mit seinen Partnerproteinen DP1-3 als transkriptioneller Aktivator wirken. Cyclin E/Cdk2 trägt ebenfalls über die Kinasierung von pRb zur Regulation der pRb-E2F-Bindung und damit zur Zellzyklusprogression bei (Kelly, *et al.*, 1998). Die verwandten Pocketproteine p107 und p130 sind als Substrate von Cyclin E beschrieben worden und üben ebenfalls zellzyklusrelevante, inhibitorische Funktionen aus, binden jedoch andere E2F-Proteine (E2F-4 und E2F-5) als pRB (E2F1-3) (Ashizawa, *et al.*, 2001; Hannon, *et al.*, 1993).

Als weiteres Cdk-Substrat ist z.B. das Protein Nucleophosmin (NPM/B23), das von Cyclin E/Cdk2-Komplexen phosphoryliert wird, beschrieben worden (Chan, *et al.*, 1989; Okuda, *et al.*, 2000; Spector, *et al.*, 1984; Tokuyama, *et al.*, 2001). Es verbindet diese regulierende Kinaseaktivität mit dem Zentrosomenzyklus, da die Replikation der Zentrosomen beginnend mit dem G₁-S-Phasen-Übergang durch unphosphoryliertes Nucleophosmin verhindert und nach Phosphorylierung von NPM/B23 durch Cyclin E/Cdk2 initiiert wird (Winey, 1999). Dies erklärt die Abhängigkeit der Zentrosomenreplikation von der Aktivität des Cyclin E/Cdk2-Kinasekomplexes und verbindet diese mit der beschriebenen Funktion von Cyclin E in der Induktion der chromosomalen Instabilität (Hinchcliffe, *et al.*, 1999; Lacey, *et al.*, 1999; Matsumoto, *et al.*, 1999b; Mussman, *et al.*, 2000; Spruck, *et al.*, 1999).

Weiterhin ist das kürzlich als Substrat von Cyclin E/Cdk2 identifizierte Protein p220^{NPAT} ein kritischer Regulator der *Histon*-Gen-Transkription, der durch direkte phosphorylierungsabhängige Bindung an die chromosomalen *Histon*-Gen-„Cluster“ wirkt (Ma, *et al.*, 2000; Zhao, *et al.*, 1998; Zhao, *et al.*, 2000). p220^{NPAT} stellt ein neues Bindeglied zwischen der Cyclin E-Expression und seiner Wirkung in der S-Phase-Induktion dar.

Außerdem sind verschiedene Substrate des Cyclin B/Cdk1-Holoenzym beschrieben, deren Eigenschaften die Bedeutung dieses Kinasekomplexes für die geordnete Zellteilung gut wiedergeben (Zachariae, 1999). Dabei sind verschiedene dieser Substrate in die Regulation des geordneten Ablaufs der Mitose involviert und sorgen z.B. für die korrekte und rechtzeitige Trennung der Schwesterchromatiden oder die Aktivierung des APC/C.

1.2.4 Signalintegration auf der Ebene des Zellzyklus

Der Zellzyklus wird durch eine Vielzahl von Signalen moduliert, die auf Grund von Ereignissen innerhalb einer einzelnen Zelle ausgesandt wurden oder aus dem extrazellulären Kompartiment stammen. So ist zum Beispiel das p53-Protein ein Regulator des Zellzyklus, da es nach DNA-Schädigung die Expression des inhibitorischen Proteins p21^{Cip1} über eine Regulation der Transkription erhöht, somit den Zellzyklus arretiert und damit ein Fortschreiten der Proliferation zu Gunsten der Reparatur der Schäden verhindert (Mowat, 1998; Weinert, 1998). Die Stimulation von Zellen durch Wachstumsfaktoren wie z.B. *fibroblast growth factor* (FGF) oder *epithelial growth factor* (EGF), die nur in der G₁-Phase des Zyklus bis zum R-Punkt wirken, endet über verschiedene Wege in der Modulation des Zellzyklus. Durch Wachstumsfaktoren werden verschiedene Signalkaskaden in Gang gesetzt, deren Endziel meist ein Stellglied des Zellzyklus ist, wie z.B. die Cyclin D1-Transkription als Ziel des Ras/Raf/ERK-Signalweges (Marshall, 1999). Weiterhin sei beispielhaft das p27^{Kip1}-Protein als Ziel von TGF- β oder IL-2 und CSF-1 genannt, die die p27^{Kip1}-Konzentration erhöhen bzw. erniedrigen und dadurch Einfluß auf die Aktivität der Cdks nehmen (Ravitz und Wenner, 1997). Außerdem wird p27^{Kip1} auch durch Aktivierung des Ras/Raf/ERK-Signalwegs inaktiviert und im Gegenzug bei fehlenden Wachstumssignalen akkumuliert (Lloyd, 1998). Letzteres bedingt, zusammen mit einem verstärkten Abbau von D-Typ-Cyclinen, den Übertritt in die G₀-Phase, was p27^{Kip1} zu einem kritischen Regulator des Ein- und Austritts in die G₀-Phase macht (Sherr, 1996).

1.2.5 Kontrolle des G₁-/S-Phase-Überganges

(Reed, 1997)

Da in den vorangegangenen Abschnitten die Konstituenten und Mechanismen der Zellzykluskontrolle höherer eukaryontischer Zellen einzeln beschrieben wurden, soll nun beispielhaft das Gesamtbild des Zusammenspiels aller Faktoren bei der Regulation der G₁-S-Progression nochmals dargelegt werden (s. Abb. 9). Das Retinoblastoma-Protein inhibiert den Übergang in die S-Phase durch Inhibition von E2F und transkriptionelle Repression im Zusammenspiel mit Histondeacetylasen und Chromatin remodellierenden Komplexen (SWI/SNF). Der Übergang von der G₁- in die S-Phase wird von mitogenabhängigen Cyclin D/Cdk4/6- und -unabhängigen Cyclin E/Cdk2-Kinasekomplexen positiv durch Phosphorylierung von pRb und dem daraus folgenden Umbau von E2F-haltigen Komplexen gesteuert. Die Aktivität der Cyclin/Cdk-Holoenzyme wird negativ durch CKIs der Ink4- und Cip/Kip-Familie reguliert, welche wiederum durch extrazelluläre Signale induziert werden und dann einen Zellzyklus-Arrest auslösen können. Als äußere Stimuli beeinflussen z.B. Wachstumsfaktoren, Kontaktinhibition, Strahlung oder auch chemische Substanzen den Zellzyklus via Signaltransduktion über Smad-Proteine, p53 oder auch den Ras-Signalweg. Dabei können sowohl fördernde als auch hemmende, zellzyklusregulatorische Proteine induziert werden, die Cycline und Cdks regulieren.

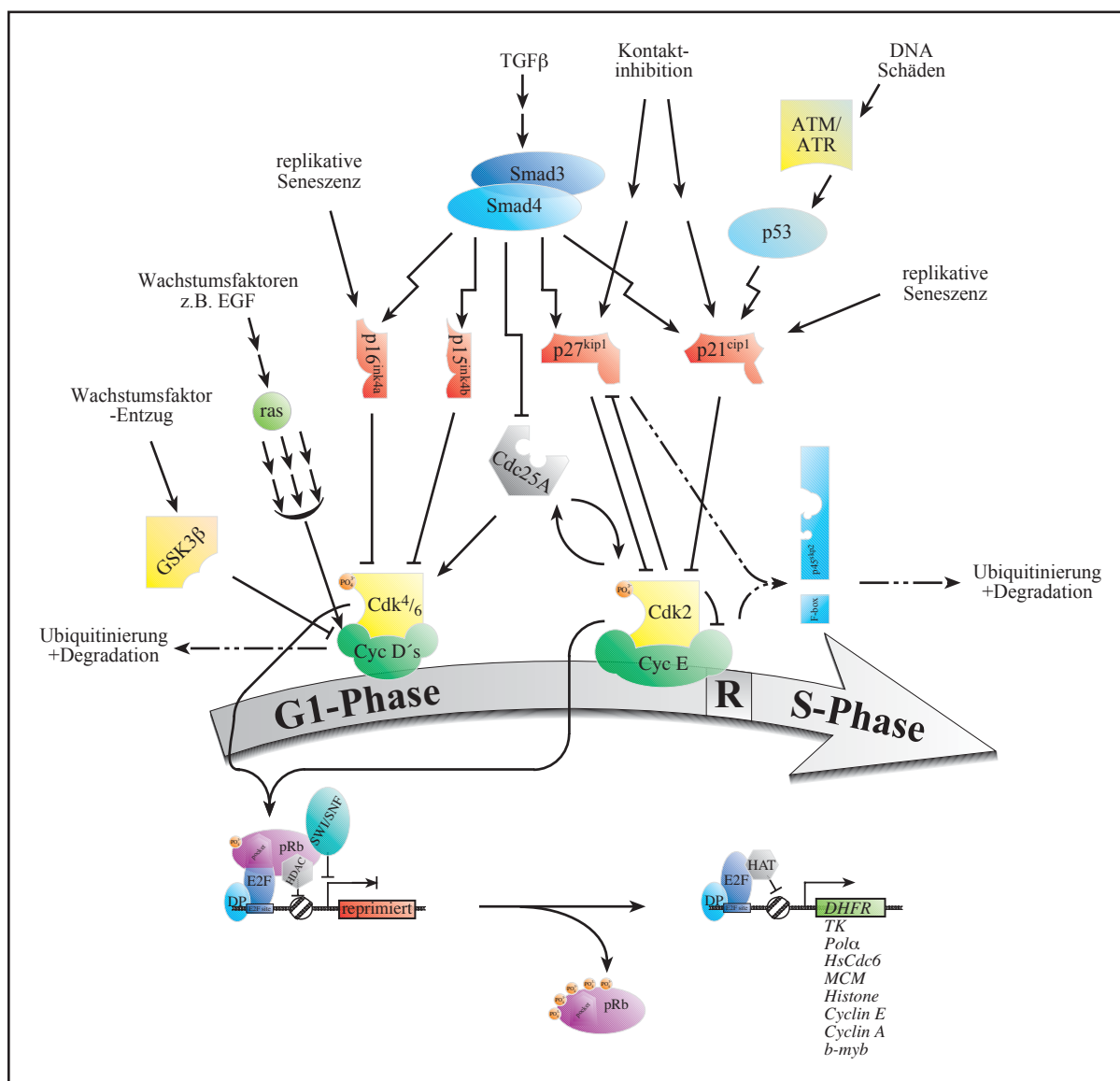


Abb. 9: Die Regulation des G₁-S-Phasen-Übergangs

Schematisch gezeigt sind die beteiligten Proteine, Signaltransduktionswege, Enzymreaktionen und Genloci.

1.3 Der Zellzyklus in der Tumorigenese

Der Ausfall eines oder mehrerer Teile der komplizierten Kontroll- und Steuerungsmechanismen der Zellzyklusprogression kann fatale Folgen für die betroffene Zelle bzw. den Organismus haben. Fast alle untersuchten Tumoren weisen unabhängig von ihrer Gewebeherkunft und Genese Veränderungen in der Zellzykluskontrolle auf. Fehlfunktionen in der Zellzyklusregulation können aus mehreren Gründen Relevanz für die Tumorbildung haben. Zum Einen können Mutationen in zellzyklusregulatorischen Genen eine erhöhte Proliferation veranlassen, die charakteristisch für maligne transformierte Zellen ist. Zum Anderen kann die Frequenz von sekundären somatischen Mutationen durch primäre Mutationen in Zellzykluskontrollgenen gefördert werden und eine Vielzahl von phänotypischen Abnormalitäten in Tumoren bewirkt werden, wie z.B. der Verlust von Differenzierung, Invadierungspotential, Angiogenese oder Metastasierung. Somit wären die Gene der Zellzykluskontrolle sowohl Ziele

von Mutationen, als auch Teile des Mechanismus der somatische Mutationen während der Tumorigenese generieren kann. Dabei ist das Zusammenspiel der Tumorsuppressorgene und der Onkogene, deren Proteinprodukte den Zellzyklus regeln, ein fein reguliertes Gleichgewicht, dessen Störung zur Tumorentstehung beitragen kann.

1.3.1 Tumorsuppressorgene überwachen den Zellzyklus

(Hanahan und Weinberg, 2000; Macleod, 2000; Sherr, 2000)

Tumorsuppressorgene sind solche Gene, deren Funktionsverlust die Entwicklung von humanen Tumoren fördert. Neben *p53* oder *APC* ist das Paradebeispiel des Tumorsuppressorgenes, deren Produkt auch in der Zellzyklusregulation eine entscheidende Rolle spielt, das *Retinoblastom*-Gen (Bienz, 1999; Friend, *et al.*, 1986; Fung, *et al.*, 1987; Lee, *et al.*, 1987; Mowat, 1998). Es trägt seinen Namen auf Grund der Entdeckung seiner Bedeutung als mutiertes Gen in der Genese des erblichen oder spontanen kindlichen Retinoblastoms bzw. des adulten Osteosarkoms. Es wird in einer Reihe von Tumoren mutiert gefunden und ist ein nicht nur für die Transformation entscheidender Inhibitor der G₁-S-Phasen-Progression (Adams und Kaelin, 1998) (s. 1.2.3).

Allerdings ist auch jedes Gen, dessen Produkt als Inhibitor der zellzyklusregulatorischen Kinasekomplexe fungiert, ein potentiell Tumorsuppressorgen (Hunter und Pines, 1994). Insbesondere *p16^{Ink4a}* ist in der Krebsforschung von besonderem Interesse, da es in über 80 % aller Tumoren mutiert oder inaktiviert vorliegt und seine Mutation als erbliche Tumorprädisposition gefunden wurde (Hall und Peters, 1996; Hirma und Koeffler, 1995; Hussussian, *et al.*, 1994; Kamb, *et al.*, 1994; Nobori, *et al.*, 1994). Außerdem erhärtet die hohe Spontantumorraten in *p16^{Ink4a}*-defizienten Mäusen die wichtige Funktion des Gens als Tumorsuppressorgen innerhalb des *p16^{Ink4a}/Cyclin D/Cdk4/6/p Rb*-Signalweges (Serrano, *et al.*, 1996) (s. 1.2.2.1.1). Im Gegensatz zu *p16^{Ink4a}* konnte unter den übrigen Mitgliedern der Ink4-Familie bislang nur für *p15^{Ink4b}* eine Bedeutung in der Tumorentstehung gefunden werden, wobei Mutationen im *p15^{Ink4b}*-Gen in der Mehrheit mit *p16^{Ink4a}*-Mutationen einhergehen (Hirma und Koeffler, 1995; Latres, *et al.*, 2000).

Für die CKIs *p21^{Cip1}* und *p27^{Kip1}* konnten keine Mutationen in humanen Tumoren gefunden werden, somit erfüllen sie nicht die Kriterien für die Einstufung als Tumorsuppressoren. Hingegen ist *p27^{Kip1}* als putatives Tumorsuppressorgen in Mäusen, durch seine Haploinsuffizienz und die negative prognostische Bedeutung seiner fehlenden Expression in humanen Tumoren etabliert (Fero, *et al.*, 1998; Kiyokawa, *et al.*, 1996; Lloyd, *et al.*, 1999; Nakayama, *et al.*, 1996; Slingerland und Pagano, 2000; Tsihlias, *et al.*, 1999). Mit *p57^{Kip2}* liegt ein weiteres, mit Wilms Tumoren (Koi, *et al.*, 1993) assoziiertes, potentiell Tumorsuppressorgen vor, für dessen Beteiligung an der Tumorentstehung es jedoch widersprüchliche Befunde gibt (Bonilla, *et al.*, 1998; Hatada, *et al.*, 1996; Lai, *et al.*, 2000; Matsumoto, *et al.*, 2000; O'Keefe, *et al.*, 1997; Shin, *et al.*, 2000; Thompson, *et al.*, 1996).

Abschließend ist zu bemerken, daß die Bedeutung der CKIs als Tumorsuppressoren bei der Tumorentstehung auf Grund ihrer Inaktivierung durch virale Onkoproteine wie E6 und E7 deutlich wird (Funk und Galloway, 1998).

1.3.2 Onkogene regulieren den Zellzyklus

(Hanahan und Weinberg, 2000; Hunter und Pines, 1994; Prober und Edgar, 2001)

Als Protoonkogene bezeichnet man die Gene, deren Deregulation einen malignen Phänotyp aktiv beeinflusst. Neben „klassischen“ Protoonkogenen wie *Ras* oder *Myc* finden sich auch solche, die direkt in die Regulation des Zellzyklus involviert sind. Dabei handelt es sich fast immer um Regulatoren des G₁-S-Phase-Übergangs. Bislang sind Mutationen in mehreren Genen bekannt, die im p16^{Ink4a}/Cyclin D/Cdk4/6-pRb-Signalweg eine Rolle spielen. So wurde z. B. in einem Melanom eine Punktmutation im *Cdk4*-Gen gefunden, die eine verringerte Bindung des Cdk4-Proteins an seinen Inhibitor p16^{Ink4a} bewirkt und dadurch ein verstärktes Signal über Hyperphosphorylierung des pRb-Proteins hervorruft (Wölfel, *et al.*, 1995). Außerdem ist das Cdk4/6 aktivierende Protein Cyclin D1 häufig in Tumoren überexprimiert und das *Cdk4*-Gen wurde auch in einem tumorspezifischen Amplikon gefunden (Hall und Peters, 1996). Zusammen mit ihrer onkogenen Wirkung in Kooperation mit Ha-Ras und der häufigen Überexpression von Cyclin D1 in humanen Karzinomen führte dies zur Einstufung von *Cdk4* und *Cyclin D1* als Onkogene (Donnellan und Chetty, 1998; Haas, *et al.*, 1997b; Lovec, *et al.*, 1994b; Rodriguez-Puebla, *et al.*, 1999).

Verschiedene Tiermodelle, bei denen einzelne potentiell onkogen wirkende Zellzyklusgene gewebespezifisch überexprimiert werden, belegen die tumorigene Wirkung z.B. von Cyclin D1, E2F, Cdc25B oder auch Cyclin E in transgenen Mäusen (Bodrug, *et al.*, 1994; Bortner und Rosenberg, 1997; Johnson, 2000; Karsunky, *et al.*, 1999; Lovec, *et al.*, 1994a; Ma, *et al.*, 1999; Wang, *et al.*, 2000; Wang, *et al.*, 1994; Yao, *et al.*, 1999).

Auch verschiedene virale Onkogene, wie z.B. *E6* und *E7* aus HPV, das Adenovirus *E1A* oder *large T-antigen* des Simian Virus wirken durch ihre Zellzyklusbeeinflussung transformierend und bestätigen die Bedeutung von Zellzyklusstörungen für die Tumorentstehung (Jansen-Dürr, 1996).

Da Cyclin E ein wichtiges Ziel des in fast allen Tumoren gestörten p16^{Ink4a}/Cyclin D/Cdk4/6-pRb Signalweges ist (Geng, *et al.*, 1999), erhält es eine Bedeutung in der Krebsentstehung, die zunehmend untersucht und durch eine Vielzahl publizierter Studien unterstützt wird.

1.4 Cyclin E in der Onkogenese

(Donnellan und Chetty, 1999)

Cyclin E gelangt, neben dem bekannten, durch Translokation als Onkogen wirkenden *Cyclin D1* (*PRAD1/Bcl1*), das z.B. in Brusttumoren und Lymphomen eine Rolle spielt (Fantl, *et al.*, 1993; Hunter und Pines, 1994; Motokura, *et al.*, 1991; Sutherland, *et al.*, 1995), immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses, da es in vielen Tumoren überexprimiert vorliegt und der genomische

Lokus, auf Chromosom 19q12-q13, häufig amplifiziert ist (Demetrick, *et al.*, 1995). Außerdem gibt es verschiedenste, experimentelle und analytisch-statistische Hinweise, die Cyclin E eine Bedeutung sowohl in der Tumorentstehung, als auch in der Tumorprogression zuordnen:

Das hohe Expressionsniveau von Cyclin E und eine geringe Menge von p27^{Kip1} bedingen eine schlechte Prognose bei Brustkrebs (Catzavelos, *et al.*, 1997; Fredersdorf, *et al.*, 1997; Keyomarsi, *et al.*, 1994; Nielsen, *et al.*, 1996; Porter, *et al.*, 1997; Scott und Walker, 1997; Tan, *et al.*, 1997). Jedoch ist die Überexpression von Cyclin E nicht ausreichend um auch die Aktivität des Cyclin E/Cdk2-Komplexes zu erhöhen, so daß die Überexpression alleine noch nicht als Maß für erhöhte Kinaseaktivität gewertet werden kann (Sweeney, *et al.*, 1998). Weiterhin ist die Überexpression von Cyclinen nicht in allen Fällen mit einer erhöhten Proliferationsrate des Tumors korreliert (Dutta, *et al.*, 1995; Porter, *et al.*, 1997). Außerdem gibt es Befunde, nach denen die Menge an Cyclin E-Protein mit dem Phosphorylierungsstatus des pRb-Proteins und der Proliferation korreliert, wobei die Mengen der Inhibitoren p21^{Cip1} und p27^{Kip1} ebenfalls von Bedeutung sind (Loden, *et al.*, 1999). Es erscheinen daher auch andere Mechanismen wahrscheinlich, durch die eine erhöhte Cyclin E-Expression onkogen wirken kann, da die beteiligten Proteine zusätzlich an anderen Prozessen als der Proliferationskontrolle beteiligt sind, wie z.B. der Differenzierung, Apoptose oder auch der Zelladhäsion (Han, *et al.*, 1996; Kranenburg, *et al.*, 1995; Sofer-Levi und Resnitzky, 1996; Zhu, *et al.*, 1996).

In Tumoren des Magen-Darm-Trakts tritt ebenfalls häufig eine Überexpression von Cyclin E auf und es besteht eine Korrelation der Cyclin E- und p21^{Cip1}/p27^{Kip1}-Proteinmenge mit der Invasivität und dem Stadium des Tumors (Akama, *et al.*, 1996; Akama, *et al.*, 1995; Nakamura, *et al.*, 1997; Yasui, *et al.*, 1997). Die Akkumulation des Cyclin E-Proteins stellt in der Entstehung von Kolonkarzinomen einen Marker für den Übergang von Adenomen zu Adenokarzinomen dar und korreliert mit dem Status des Karzinoms und den Mengen an p53- und Ki-67-Protein (Sakaguchi, *et al.*, 1998; Wang, *et al.*, 1996; Yasui, *et al.*, 1996). Weiterhin gibt es Hinweise für eine ähnliche, prognostische Bedeutung von Cyclin E in verschiedenen Formen von Lymphomen, Zervix- und endometrialen Karzinomen, Lungenkarzinomen, Kehlkopfkarzinomen und Sarkomen (Dong, *et al.*, 2000; Erlanson, *et al.*, 1998; Fukuse, *et al.*, 2000; Iida, *et al.*, 1997; Li, *et al.*, 1996a; Li, *et al.*, 1996b; Molendini, *et al.*, 1998; Müller-Tidow, *et al.*, 2001; Smith, *et al.*, 1997; Wolowiec, *et al.*, 1995). Da Cyclin E in den Zentrosomenzyklus involviert ist (s. 1.2.4) und Zentrosomenamplifikationen zur genetischen Instabilität in humanen Karzinomen beitragen, betont dies zusammen mit der Implikation von überexprimiertem Cyclin E bei chromosomaler Instabilität die Bedeutung der Überexpression dieses Proteins für die Tumorentstehung (Carroll, *et al.*, 1999; Lingle, *et al.*, 1998; Pihan, *et al.*, 1998; Spruck, *et al.*, 1999). Allerdings muß erwähnt werden, daß es Studien gibt, die keine Korrelation zwischen der Überexpression von Cyclinen und der Prognose oder dem Tumorstatus finden (Matsumoto, *et al.*, 1999a). Außerdem konnte gezeigt werden, daß ein hohes Cyclin E-Expressionsniveau nicht nur mit schlechter Prognose verbunden ist, sondern auch mit erfolgreicher Therapie z. B. durch kombinatorische Chemotherapie mit Cisplatin und Taxol oder Bestrahlung (Sirzen, *et al.*, 1997; Smith und Seo, 2000).

Weiterhin haben auch Tumorstämme, wie das humane Papillomavirus (HPV), das Zytomegalievirus (CMV) oder Herpesviren, einen Einfluß auf den Status von Cyclin E. So haben Proteine, die in die karzinogene Transformation von Gebärmuttergewebe involviert sind, HPV einerseits eine, die Cyclin E-Expression aktivierende, Wirkung und beeinflussen andererseits die Aktivität von Cyclin E/Cdk2-Komplexen positiv durch direkte Bindung oder indirekt durch Bindung von inhibitorischen p21^{Cip1}-Molekülen (Jones, *et al.*, 1997; Martin, *et al.*, 1998; McIntyre, *et al.*, 1996; Vogt, *et al.*, 1999; Zeff, *et al.*, 1995). Durch die Wirkung des HPV kann die Bedeutung von Cyclin E als wichtiger, früher Faktor bei der Entstehung von Zervixkarzinomen erklärt werden und somit erscheint eine prognostische Analyse der Cyclin E-Expression beim Zervixkarzinom sinnvoll (Cho, *et al.*, 1997; Mate, *et al.*, 1998; Quade, *et al.*, 1998). Durch die Funktion der CKI-Inaktivierung entfalten das CMV und die Herpesviren ihre proliferationsfördernde Wirkung (Bresnahan, *et al.*, 1996; Swanton, *et al.*, 1997).

Auf unterschiedliche Weise wurde bislang versucht die mögliche Rolle von Cyclin E in der Tumorentstehung experimentell zu untersuchen. Transgene Mäuse, die gewebespezifisch Cyclin E überexprimieren, entwickeln unter bestimmten Umständen Tumoren. Bei Expression von Cyclin E in Brustdrüsenepithelzellen von transgenen Mäusen, zeigen die weiblichen Tiere dieser Linien ein verstärktes Auftreten von Brusttumoren nach der ersten Laktation, ähnlich wie dies bei *Cyclin D1*, aber nicht bei *Cyclin A* transgenen Tieren der Fall ist (Bortner und Rosenberg, 1995; Bortner und Rosenberg, 1997; Wang, *et al.*, 1994). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Cyclin E-Überexpression in T-Zellen keine eigene tumorigene Wirkung hat, sondern nur durch chemische Mutagenese unterstützt eine Erhöhung der basalen Tumorentstehung bewirkt (Karsenty, *et al.*, 1999). Zwar ist eine weitere Analyse durch Kreuzung mit anderen transgenen Stämmen, zur Untersuchung der onkogenen Kooperation, nicht durchgeführt worden, jedoch kooperiert *Cyclin E* mit aktivierenden Mutationen im *ki-ras*-Gen. Dies weist auf den gleichen Wirkmechanismus hin, wie die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Ergebnisse, die zeigen, daß Cyclin E mit konstitutiv aktivem Ha-Ras bei der Transformation von primären Ratten-Embryo-Fibroblasten kooperiert (Haas, *et al.*, 1997a). Diese Kooperation wurde auch schon für Cyclin D1 und Cdk4 gezeigt und scheint einen generellen Wirkungsmechanismus von positiven G₁-Zellzyklusregulatoren in der malignen Transformation darzustellen (Haas, *et al.*, 1997b; Lovett, *et al.*, 1994b).

Zusammenfassend kann eine zunehmende Bedeutung der Analyse von Cyclin E in der Tumordiagnostik und eine Häufung von experimentellen Hinweisen für die onkogene Wirkung von Cyclin E festgestellt werden. Ob jedoch Cyclin E eine besondere Bedeutung als eigenständiges Protoonkogen in der Genese von (humanen) Tumoren besitzt oder nurmehr ein Verbindungsglied für andere Mechanismen darstellt bleibt weiter zu untersuchen.

1.5 Fragestellung: Welche sind die notwendigen und hinreichenden Eigenschaften von Cyclin E während der Transformation von Zellen?

In dieser Arbeit soll der Mechanismus der malignen Transformation durch Cyclin E (Haas, *et al.*, 1997a) untersucht werden. Als Arbeitshypothese wurden folgende Modelle entwickelt:

- a) Durch Überexpression von Cyclin E werden inhibitorische Proteine wie p21^{Cip1} oder p27^{Kip1} an freies Cyclin E gebunden und die endogene Zellzyklus-Maschinerie von ihren Inhibitoren befreit. Eine ungehinderte Proliferation über den G₁-S-Übergang hinweg wird ermöglicht.
- b) Die kinaseaktivierende Eigenschaft des Cyclin E bewirkt direkt eine Erhöhung der Aktivität von Cdk2 und somit ein starkes Signal den Restriktionspunkt zu überlaufen.
- c) Durch die auf Grund der Überexpression von Cyclin E wahrscheinlich erhöhte Kinaseaktivität wird das inhibitorische Protein p27^{Kip1} vermehrt phosphoryliert und dadurch auch verstärkt abgebaut. Dies würde wiederum eine der wichtigen Zellzyklusinhibitoren außer Kraft setzen und der Zelle eine ungehemmte Proliferation ermöglichen.
- d) Wegen der Überexpression von Cyclin E könnte auch der regulierte Abbau des Proteins gestört werden und dadurch zu einer erhöhten Kinaseaktivität führen.
- e) Eine weitere Möglichkeit der Wirkung von überexprimiertem Cyclin E Protein wäre eine unspezifische Aktivierung von Kinasen, die unter normalen Bedingungen nicht durch Cyclin E aktiviert werden.
- f) Schließlich ist auch eine Auswirkung der Cyclin E Überexpression auf die Stabilität des Genoms an sich und dadurch ermöglichte Amplifikationen, Deletionen, Inversionen, Deaktivierungen oder andere Vorgänge ein Einfluß auf die Tumorentstehung denkbar.

Als grundlegendes experimentelles Modell soll die Transformation primärer Ratten Embryo Fibroblasten („REF-assay“) verwendet werden, um die transformierenden Eigenschaften von Cyclin E und verschiedener Deletionsmutanten zu untersuchen. Dabei gilt es neben den schon vorhandenen Mutanten weitere zu generieren, um möglichst das gesamte Protein durch Deletionen beschreiben zu können und diese in die Versuchsreihe mitaufzunehmen. Weiterhin soll biochemisch untersucht werden, welche Eigenschaften diese mutierten Cyclin E-Proteine besitzen, d.h. ob sie die bekannten Fähigkeiten des wt-Proteins besitzen und welche davon notwendig bzw. hinreichend für die Transformation sind. Ebenfalls zu untersuchen sind die Eigenschaften der mutierten Proteine im zellulären Kontext, also welche Leistungen des normalen Cyclin E-Proteins in einer Zelle die mutanten Proteine noch erbringen können? Von übergeordnetem Interesse ist natürlich die Zusammenfassung der Einzeldaten zu einem möglichst kompletten Gesamtbild, das die Eigenschaften von Cyclin E, die zur Transformation einer Zelle beitragen, beschreibt und soweit möglich erklärt.

2. Ergebnisse

2.1 Mutanten und Spleißvarianten des zellzyklusregulatorischen Proteins Cyclin E

Zu Beginn der Arbeit war über die Struktur des humanen Cyclin E-Proteins bekannt, daß es die sog. „Cyclin-Box“ enthält und eine für den Abbau des Proteins verantwortliche „PEST-Sequenz“. Weiterhin waren zwei Spleißvarianten Cyclin E_S und Cyclin E_T isoliert worden, sowie eine N-terminal um 15 AS längere Variante des ursprünglich als Wildtyp publizierten Proteins (Koff, *et al.*, 1991; Lew, *et al.*, 1991; Mumberg, *et al.*, 1997; Ohtsubo, *et al.*, 1995; Sewing, *et al.*, 1994). Inzwischen wurden weitere Spleißvarianten beschrieben: Cyclin E_{Δ9}, -_{Δ48}, -_{Δ97}, -_{Δ148} und -_{IN3} (Keyomarsi, *et al.*, 1995; Porter und Keyomarsi, 2000), die möglicherweise mit den zuvor erwähnten Spleißvariationen in Kombination auftreten können (s. Abb. 10).

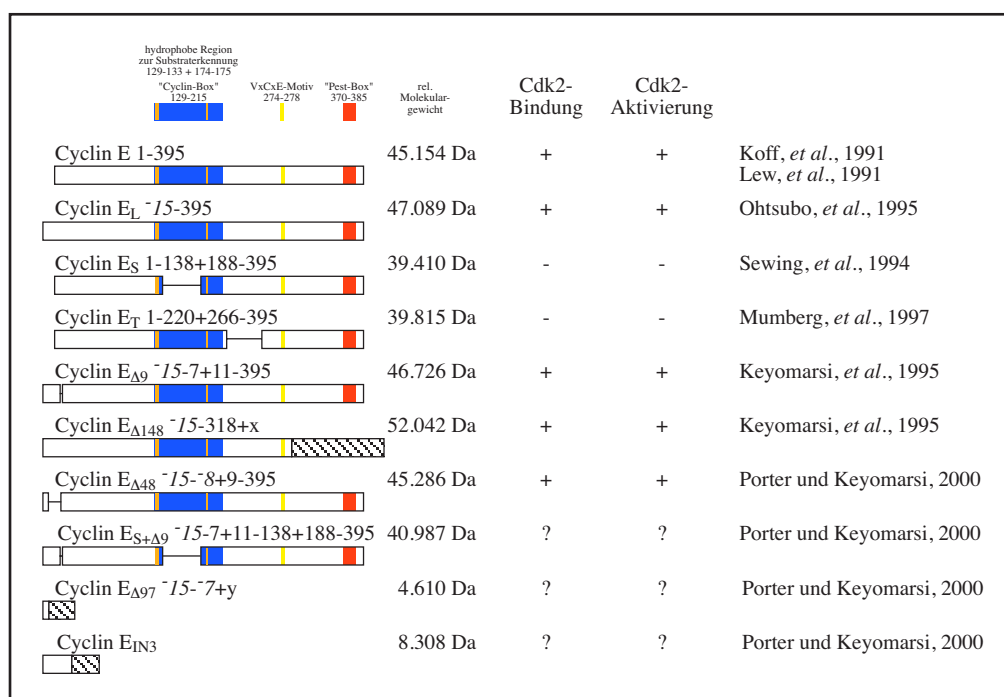


Abb. 10: Schema der publizierten Spleißvarianten des humanen Cyclin E-Proteins und ihrer bekannten Eigenschaften.

Die Cyclin E-Proteine sind als Balken in ihren relativen Größenverhältnissen dargestellt und die rechnerischen rel. Molekulargewichte sind zusammen mit den bekannten Eigenschaften angegeben. Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen relativ zu der in dieser Arbeit zu Grunde gelegten Wildtypform von Cyclin E nach Koff, *et al.*, 1991 und Lew, *et al.*, 1991 an. Die blaue Box markiert die „Cyclin-Box“ (AS: 129-215), der rote Bereich symbolisiert die „PEST-Box“ (AS: 370-385), die gelbe Box markiert das V-X-C-X-E-Motiv zur Substraterkennung von pRb (nach Kelly, *et al.*, 1998) (AS: 274-278) und die orangefarbene Felder kennzeichnen hydrophobe Bereiche, die ebenfalls zur Substraterkennung notwendig sind (nach Schulman, *et al.*, 1998) (AS: 129-133 + 174-175).

Zunächst sollte die transformierende Eigenschaft des humanen Cyclin E im Ratten Embryo Fibroblasten (REF) Transformations System (Haas, *et al.*, 1997; Land, *et al.*, 1983) (s. 5.11.5) genauer untersucht werden, wobei eine Reihe von Deletionsmutanten von Cyclin E zum Einsatz kommen sollten, die freundlicherweise von R. Müller, IMT Philipps-Universität Marburg, zur Verfügung gestellt wurden (Mumberg, 1995) (s. Abb. 11). In ersten Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) stellte sich jedoch heraus, daß es einiger weiterer Mutanten bedurfte, um den Bereich des

Cyclin E-Proteins genauer zu beschreiben, der für die transformierende Eigenschaft notwendig ist. Dazu wurden mittels PCR bzw. Restriktionsendonukleaseverdau vier neue Mutanten generiert. Dabei handelte es sich um die mutierten cDNAs für die N-terminal deletierten Formen Cyclin E 219-395 und Cyclin E 298-395, sowie für die intern deletierten Formen Cyclin E $_{\Delta\text{box}}$ 1-128+216-395 und Cyclin E $_{\Delta 1/2\text{box}}$ 1-160+221-395 (s. Abb.11).

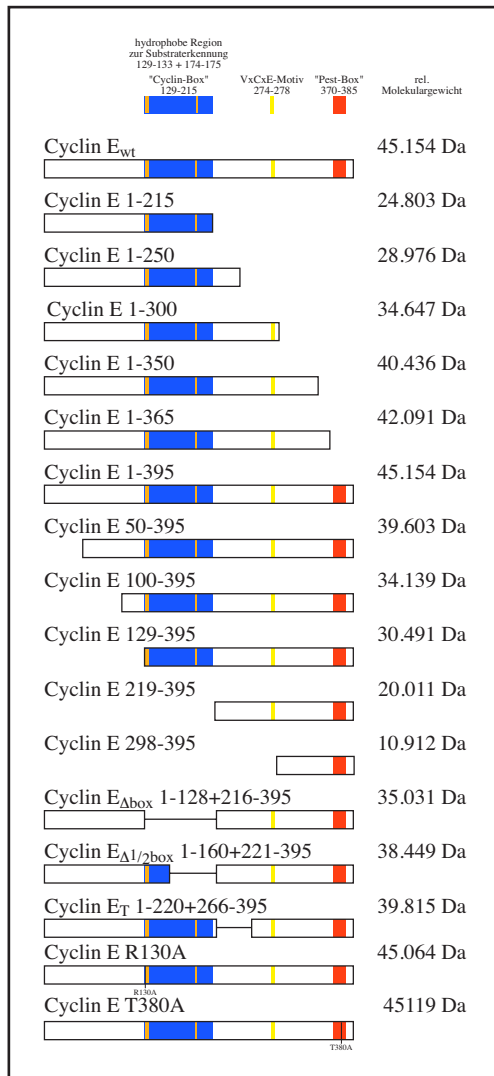


Abb. 11: Schematische Darstellung der generierten bzw. zur Verfügung gestellten Cyclin E-Mutanten.

Die Cyclin E-Proteine sind als Balken in ihren relativen Größenverhältnissen dargestellt und die rechnerischen rel. Molekulargewichte sind angegeben. Innerhalb der Balken repräsentieren die farbigen Flächen die bislang bekannten Proteinmotive bzw. funktionelle Domänen:

Die blaue Box markiert die „Cyclin-Box“ (AS: 129-215), der rote Bereich symbolisiert die „PEST-Box“ (AS: 370-385), die gelbe Box markiert das V-X-C-X-E-Motiv zur Substraterkennung von pRb (nach Kelly, *et al.*, 1998) (AS: 274-278) und die orangen Felder kennzeichnen hydrophobe Bereiche, die ebenfalls zur Substraterkennung notwendig sind (nach Schulman, *et al.*, 1998) (AS: 129-133 + 174-175).

Die beiden letzteren wurden hergestellt, da die alternative Spleißform Cyclin E_S (s. Abb. 10) (Sewing, *et al.*, 1994) nicht zur Verfügung stand und die Funktion der „Cyclin-Box“ in der Transformation untersucht werden sollte. Nach Klonierung aller deletionsmutierten cDNAs in pBluescript KS wurde eine Sequenzanalyse durchgeführt und die cDNAs *in vitro*-translatiert; beide Analysen ergaben einen korrekten Leserahmen der mutierten cDNAs und es wurden Proteine der zu erwartenden Größen generiert (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurden zwei punktmutierte cDNAs Cyclin E R130A und Cyclin E T380A (Clurman, *et al.*, 1996; Won und Reed, 1996), von J.M. Roberts, Fred Hutchinson Cancer Center, Seattle, USA, zur Verfügung gestellt und in die meisten Analysen miteinbezogen. Diese beiden Punktmutanten können die Kinase Cdk2 nicht mehr binden, bzw. nicht mehr durch Phosphorylierung für den Abbau markiert werden. Als interne Positivkontrolle wurde eine zweite wt cDNA in allen Versuchen mitanalysiert, die im weiteren Verlauf als Cyclin E 1-395 bezeichnet wird (s. Abb. 11).

2.2 Analyse der „physiologischen“ Funktionsfähigkeit von Cyclin E-Mutanten

Zur Analyse ob und welche der mutierten Proteine, *in vivo* wie das Wildtyp-Protein fungieren, wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Von primärem Interesse war die Funktion in der onkogenen Transformation im Zusammenspiel mit konstitutiv aktivem Ha-Ras-V12.

2.2.1 Transformation von primären Ratten-Embryo-Fibroblasten (REF) durch Cyclin E und seine Mutanten

Aus Vorversuchen war bekannt, daß herkömmliche Plasmide mit CMV-Promotor in REF-Transformations-Experimenten im Gegensatz zu einem Vektor mit dem viralem LTR des MoMLV (engl. Moloney murine leukemia virus) als Promotorelement nur ungenügend funktionieren. Daher sollte die Reihe von cDNAs, die für Mutanten des Cyclin E kodierten und die auf ihre transformierenden Eigenschaften hin zu untersuchen waren, in den Vektor pLTR Δ 7bp (Lovec, *et al.*, 1994; Mäkelä, *et al.*, 1992) kloniert werden. Dieser Vektor wurde zunächst mit einem Teil der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pBluescript KS versehen, um einfacheres Klonieren zu ermöglichen, und von da an pLTR-MCS+ genannt (Plasmidkarten s. 7.1). Alle mutierten cDNAs von Cyclin E, sowie verschiedene andere cDNAs (z.B. *Myc*) zu Kontrollzwecken, wurden in diesen Vektor kloniert. Die Expression der so erhaltenen Plasmide wurde mit transienten Transfektionen und Immun Blots überprüft und konnte für Cyclin E_{wt} und seine Mutanten, die einen intakten C-Terminus besitzen und daher durch den eingesetzten Antikörper erkannt wurden, mit den erwarteten relativen Molekulargewichten bestätigt werden (s. Abb. 12). Daher ist davon auszugehen, daß auch die übrigen Mutanten korrekt exprimiert werden.

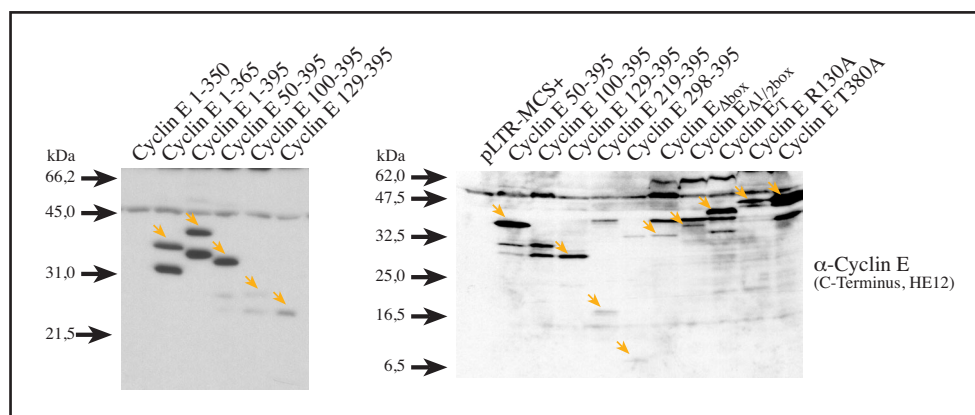


Abb. 12: Kontrolle der Expression von pLTR-MCS+-Plasmiden.

Die Plasmide mit den angegebenen cDNAs wurden transient mit der $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Methode in REF-Zellen transfiziert und die Extrakte durch SDS-PAGE und anschließendem Immun Blot mit α -Cyclin E (HE12) auf die Expression der Cyclin E-Mutanten hin überprüft.

Anschließend wurden die so erhaltenen Konstrukte zusammen mit dem Ha-Ras-V12-Plasmid pGEJ6.6 (Parada, *et al.*, 1982; Tabin, *et al.*, 1982) (s. 5.11.5 und 7.1) in Ratten-Embryo-Fibroblasten transfiziert und die Anzahl der durch kooperierende Transformation entstehenden Foci nach 12 Tagen ermittelt (Land, *et al.*, 1983) (s. Abb. 13). Wie bereits beschrieben (Haas, *et al.*, 1997), entwickelten sich nach Kotransfektion von Cyclin E_{wt} und Ha-Ras-V12 transformierte Zellen, die klonal zu Zellhaufen wuchsen. Auch für die meisten der untersuchten Mutanten von

Cyclin E zeigten die Ergebnisse der Transformations-Versuche (s. Abb. 13), daß sie noch in der Lage sind die primären Fibroblasten in Kooperation mit konstitutiv aktivem Ha-Ras-V12 zu transformieren. Nur die größten Deletionen verhindern dies, was am fehlenden Transformationspotential der Mutanten Cyclin E 1-215, - 1-250, - 1-300, sowie Cyclin E 219-395 und - 298-395 zu sehen ist. Die Expression dieser sehr stark verkürzten Proteine war nicht ausreichend, um die Transformation zu induzieren, während dies z.B. durch die intern in der „Cyclin-Box“ deletierten Formen von Cyclin E noch möglich war.

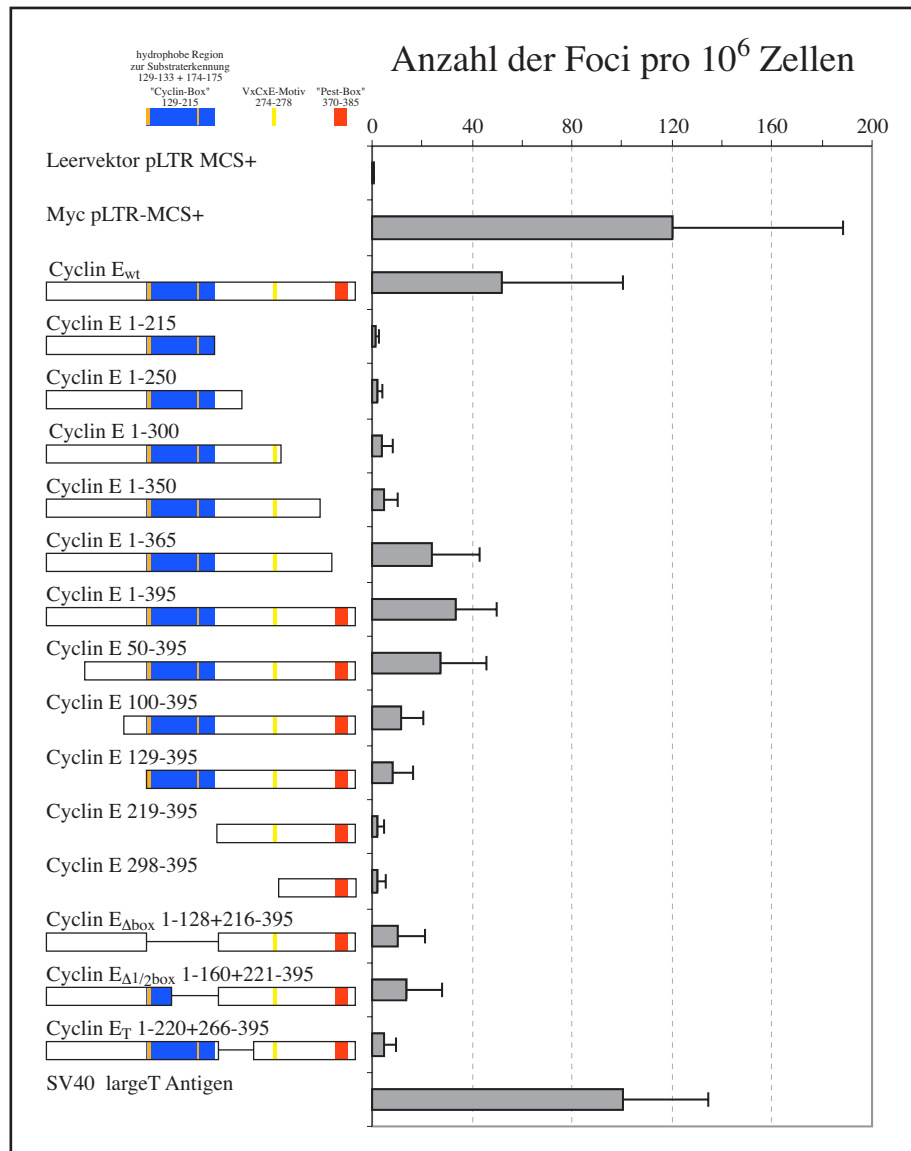


Abb. 13: Graphische Darstellung der transformierenden Eigenschaften von Cyclin E-Mutanten.

Primäre REF wurden mit den angegebenen Plasmiden und mit pGEJ6.6 (Ha-Ras-V12) nach der $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Methode kotransfiziert und die Anzahl von Foci nach 14 Tagen ermittelt. Die Balken geben die Mittelwerte der ausgezählten Foci aus 8 Einzelexperimenten wieder und der Fehlerbalken repräsentiert die Standardabweichung.

Generell ist die stark von Experiment zu Experiment schwankende Anzahl an Foci zu bemerken, was sich auch in den hohen Standardabweichungen widerspiegelt. Wahrscheinlich läßt sich dies auf unterschiedliche Transfektionseffizienzen und verschiedene Qualitäten der verwendeten Fibroblasten je nach Präparation und Kultivierung zurückführen. Es konnten in einigen Fällen

stabile Zelllinien aus einzelnen Foci etabliert werden, auf die im weiteren noch eingegangen wird (s. 2.4). Für die Mutante Cyclin E 1-300 konnte keine definitive Aussage getroffen werden, ob sie transformierende Eigenschaften besitzt oder nicht, denn die Anzahl der beobachteten Foci schwankte stark und es konnte keine stabil diese Mutante überexprimierende Zelllinie aus einem der Foci etabliert werden. Dies war im Gegensatz dazu bei allen anderen positiv transformierend wirkenden Cyclin E-Mutanten der Fall. Bei den vermeintlich durch Cyclin E 1-300 transformierten Zellen, die sich als Linien kultivieren ließen, handelte es sich um Transformanden, die die Mutante Cyclin E 1-365 überexprimierten. Daher ist eine Verwechslung oder Kontamination bei der Transfektion oder der Etablierung und Passagierung der Zellen anzunehmen. In weiteren Versuchen mit Cyclin E 1-300 Foci zu generieren (Daten nicht gezeigt) konnte dieser Mutante kein transformierendes Potential nachgewiesen werden. Ebenso konnte für die erst später in die Experimente einbezogene Punktmutante Cyclin E R130A keine Kooperation mit Ha-Ras-V12 in der Transformation von primären REF beobachtet werden, während dies für die zweite Punktmutante Cyclin E T380A gelang (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Experimenten ließ sich kein Bereich von Cyclin E identifizieren, der allein für die Transformation verantwortlich ist, da verschiedene Mutanten noch transformierend wirkten, denen nur N- oder C-terminale bzw. interne Bereiche fehlten. Es bleibt festzustellen, daß mit der Größe der Deletionen das transformierende Potential abnimmt.

Außerdem wurden einige pLTR-MCS+ Konstrukte, die an GFP fusionierte Cyclin E-Mutanten enthielten in den Transformationsversuchen eingesetzt. Dabei konnte nur Cyclin E_{wt}-GFP, Cyclin E 50-395-GFP und Cyclin E 100-395-GFP transformierendes Potential zugeordnet und auch stabile Zelllinien etabliert werden.

Ha-Ras-V12 kotransfiziert mit Plasmid:	Anzahl der Foci:
pLTR-MCS+	2
Myc pLTR-MCS+	88
Cyclin E 1-250-GFP pLTR-MCS+	3
Cyclin E 1-300-GFP pLTR-MCS+	2
Cyclin E _{wt} -GFP pLTR-MCS+	26
Cyclin E 50-395-GFP pLTR-MCS+	10
Cyclin E 100-395-GFP pLTR-MCS+	5
Cyclin E 129-395-GFP pLTR-MCS+	1
Cyclin E 219-395-GFP pLTR-MCS+	0
Cyclin E $\Delta 1/2\text{box}$ -GFP pLTR-MCS+	0

Tab. 2: Ergebnisse des REF-Transformations-Assays mit GFP-fusionierten Cyclin E-Mutanten.

Primäre REF wurden mit den angegebenen Plasmiden und mit pGEJ6.6 (Ha-Ras-V12) nach der $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Methode kotransfiziert und die Anzahl von Foci nach 14 Tagen ermittelt. Angegeben ist ein repräsentatives Experiment von 3.

Jedoch zeigten die Mutanten Cyclin E 1-250-GFP, - 1-300-GFP, - 129-395-GFP, - 219-395-GFP und - $\Delta 1/2\text{box}$ -GFP keine Kooperation dieser mit Ha-Ras in der Transformation primärer REF-Zellen (s. Tab. 2 & Daten nicht gezeigt). Somit konnten die Ergebnisse mit den unfusionierten Mutanten teilweise bestätigt werden, wobei eine deutliche Abnahme der Foci-Zahlen auch für das

Wildtyp-Protein zu bemerken war. Dieser wahrscheinlich auf die Fusion mit GFP zurückzuführende Rückgang des Transformationspotentials beeinflusste die übrigen getesteten Mutanten möglicherweise so stark, daß keine Foci mehr detektierbar waren.

2.2.2 Beschleunigung der Zellzyklusprogression durch Cyclin E-Mutanten

Eine weitere charakteristische Eigenschaft von überexprimiertem Cyclin E ist die Induktion einer beschleunigten Progression in die S-Phase (Ohtsubo und Roberts, 1993; Resnitzky, *et al.*, 1994; Wimmel, *et al.*, 1994). Um diese Funktion von Cyclin E an den Mutanten zu untersuchen, sollten die entsprechenden cDNAs transient in NIH3T3-Zellen exprimiert und eine FACS-Analyse dieser Zellen durchgeführt werden. Hierzu wurden die cDNAs der Cyclin E-Mutanten in den Vektor pIRES-EGFP kloniert und die damit transfizierten Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie analysiert. Als Kontrolle dienten die CKIs p16^{Ink4a}, p21^{Cip1} und p27^{Kip1}, deren Überexpression einen Zellzyklusarrest in der G₁-Phase auslöst (Koh, *et al.*, 1995; Toyoshima und Hunter, 1994; Xiong, *et al.*, 1993). Die Expression der zu untersuchenden Cyclin E-Mutanten wurde durch Immun Blot-Analyse kontrolliert: Die analysierten Plasmide ermöglichten die Expression der gewünschten Proteine (Daten nicht gezeigt). Die transfizierten Zellen sollten von diesem einen Plasmid sowohl die inserierte cDNA, als auch das der IRES (engl.: internal ribosome entry site) nachgestellte Markermolekül exprimieren. Dies ermöglicht die Transfektion nur eines Plasmides, was eine hohe Sicherheit der Analyse ergibt, da bei Expression des Markers auch die vorgeschaltete cDNA des Interesses exprimiert werden muß. Es konnte jedoch kein Signal des von diesem Vektor kodierten Markers, des grün fluoreszierenden Proteins (GFP), detektiert werden. Auch ein Ersatz des „normalen“ GFP in diesem Vektor durch membranständige Varianten, Spektrin-GFP oder Us9-GFP (Brideau, *et al.*, 1998; Kalejta, *et al.*, 1999; Kalejta, *et al.*, 1997), ergab kein Signal in der FACS-Analyse. Somit scheint die verwendete IRES-Sequenz nicht funktionell zu sein. Um dennoch die schon fertigen Plasmide einsetzen zu können, wurden diese nun mit Us9-GFP kotransfiziert und die Zellen durchflußzytometrisch analysiert. Zwar konnte nun eine sehr deutliche Fluoreszenz des GFP detektiert werden, jedoch waren die Effekte der eingebrachten cDNAs auf die Zellzyklusverteilung der NIH3T3-Zellen nur gering (s. Abb 14 a) & b)).

Daher wurden PCR-Produkte aller cDNAs in den Vektor pFLAG-N3 kloniert. Dieser Vektor wurde ausgehend von pEGFP-N3 kloniert und trägt statt der GFP-cDNA ein Oligonukleotid, das für ein sog. „FLAG-tag“ kodiert (s. 7.1), welches im gleichen Leserahmen C-terminal an eine vorgeschaltet klonierte cDNA gehängt wird und dadurch das entstehende Protein mit einer spezifischen 8 AS langen Sequenz markiert. Die so erhaltenen Plasmide wurden erneut mit Us9-GFP im Verhältnis 5 : 1 kotransfiziert und die Zellen analysiert. Nun ergab sich nicht nur eine hohe Fluoreszenzintensität in den transfizierten Zellen, sondern auch ein starker Effekt auf den Zellzyklus durch die über den CMV-Promotor des pFLAG-N3-Plasmids exprimierten cDNAs (s. Abb. 14 c)).

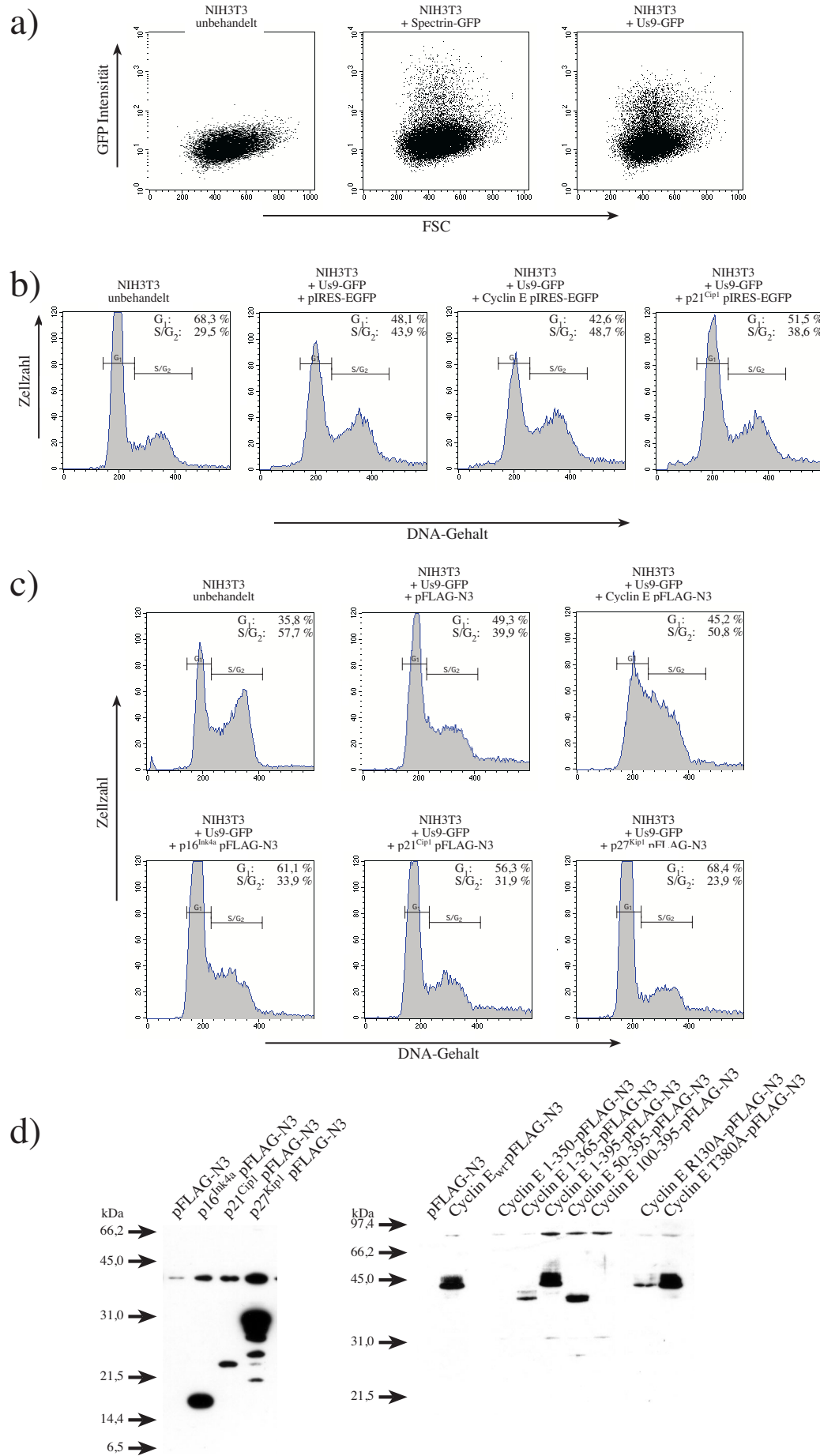
Hieraus läßt sich folgern, daß die Expressionsinduktion der beiden Vektoren unterschiedlich ist und der CMV_{ie} (immediate early) -Promotor des pIRES-EGFP-Plasmids nicht stark genug ist um die Transkription der zu untersuchenden cDNAs in ausreichendem Maße anzutreiben. Der CMV-Promotor des pFLAG-N3-Konstrukts ist dazu allerdings in der Lage und die Expression der

mRNAs bzw. Proteine kann den Zellzyklus nachhaltig beeinflussen. Die als Kontrollen eingesetzten cDNAs für p16^{Ink4a}, p21^{Cip1} und p27^{Kip1} bewirkten einen starken G₁-Arrest. Die Expression der wt cDNA von Cyclin E rief eine deutliche Beschleunigung des Eintritts in die S-Phase hervor, während der Leervektor keinen Effekt auf die Zellzyklusverteilung hatte (s. Abb. 14 & 15). Die Expressionskontrolle der pFLAG-N3-Konstrukte gelang nur für die CKIs p16^{Ink4a}, p21^{Cip1} und p27^{Kip1} ohne Probleme, sie werden in großen Mengen sowohl in NIH3T3-, als auch in HeLa-Zellen exprimiert (s. Abb. 14 d) & Daten nicht gezeigt). Hingegen erwies sich die Detektion der FLAG-fusionierten Cyclin E-Mutanten mit dem α -FLAG Antikörper als schwierig. Nur der Wildtyp, sowie die Punktmutanten Cyclin E R130A und - T380A und die Deletionsmutanten Cyclin E 1-365 und - 50-395 können in HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Die übrigen Mutanten können mit dem anscheinend recht unsensitiven α -FLAG Antikörper nicht detektiert werden, während zumindest für Cyclin E 1-215, - 1-250, - 1-300, - 100-395, 129-395, 219-395, - 298-395 und Cyclin E Δ 1/2box ebenso wie für die oben genannten Mutanten mit den spezifischen α -Cyclin E Antikörpern (HE12 & N-term) sehr starke Signale zu beobachten waren (Daten nicht gezeigt). Da nicht alle Vektoren sequenziert wurden, liegt möglicherweise bei einigen keine Fusion mit dem FLAG-Epitop vor, so daß der spezifische α -FLAG-Antikörper das exprimierte Cyclin E-Protein nicht erkennt, während dies mit α -Cyclin E-Antikörpern möglich ist. Hier wären zur Klärung DNA-Sequenzierungen notwendig.

Um nun die Wirkung der Cyclin E-Mutanten zu untersuchen, wurden auch sie in NIH3T3-Zellen transient transfiziert und die Zellzyklusverteilung analysiert. Außer dem Wildtyp konnten nur die Deletionsmutanten Cyclin E 1-365 und Cyclin E 50-395, sowie die Punktmutante Cyclin E T380A eine Zellzyklusbeschleunigung hervorrufen. Alle anderen Mutanten von Cyclin E hatten keinen Effekt (s. Abb. 15). Dies konnte in HeLa-Zellen ebenso beobachtet werden, wie bei der Verwendung von GFP-fusionierten Cyclin E-Mutanten in NIH3T3-Zellen. Somit ist der zentrale Bereich des Cyclin E-Proteins zwischen AS 50 und AS 365 für die Funktion der Stimulation der Zellzyklusprogression notwendig.

Abb. 14: Durchflußzytometrische Analyse transient transfizierter NIH3T3-Zellen.

a) Darstellung der erhöhten Fluoreszenz im GFP-Kanal nach transienter Transfektion mit Spektrin-GFP oder Us9-GFP im Vergleich zu untransfizierten Zellen. **b)** Analyse der Effekte von Cyclin E pIRES-EGFP und p21^{Cip1} pIRES-EGFP nach Kotransfektion mit Us9-GFP. Die Auswirkungen der Expression der beiden Zellzyklusregulatoren auf die Verteilung der Zellen innerhalb der Zyklusphasen sind nur sehr gering. **c)** Analyse der Effekte von Cyclin E-, p16^{Ink4a}-, p21^{Cip1}- und p27^{Kip1}-pFLAG-N3 im Vergleich mit Leervektor- oder untransfizierten Zellen. Cyclin E beschleunigt den Eintritt in die S-Phase, während p16^{Ink4a}, p21^{Cip1} und p27^{Kip1} einen G₁-Arrest hervorrufen. In b) und c) sind die prozentualen Anteile an den Zellzyklusphasen G₁ und S/G₂ angegeben. **d)** Expressionskontrolle der in c) eingesetzten Plasmide. Die angegebenen Konstrukte wurden transient in NIH3T3- (links) oder HeLa-Zellen (rechts) transfiziert und Ganzzellextrakte durch Immun Blots mit α -FLAG Antikörper auf Expression der FLAG-fusionierten cDNAs überprüft. (Abb. 14 siehe nächste Seite)



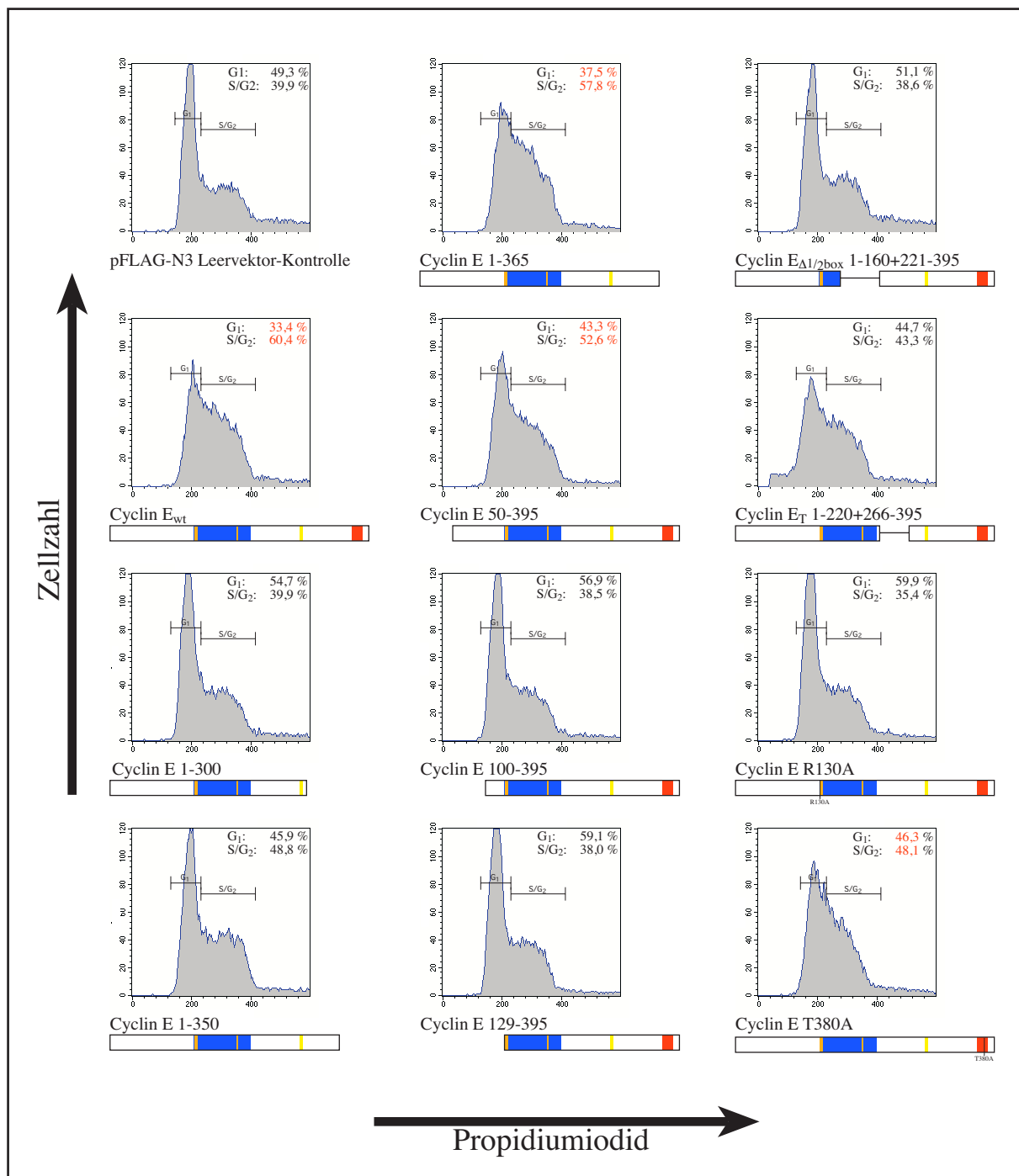


Abb. 15: Analyse der Fähigkeit von Cyclin E-Mutanten die G₁-S-Progression in NIH3T3-Zellen zu beschleunigen.

Durchflußzytometrisch wurden transient mit Us9-GFP und pFLAG-N3-Plasmiden (Verhältnis 1:5) transfizierte NIH3T3-Zellen auf ihre Zellzyklusverteilung hin analysiert. Dazu wurden mindestens 1×10^4 GFP-positive Zellen elektronisch ausgewählt und ihr DNA-Gehalt über Propidiumiodid-Fluoreszenz bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Beispiele einiger Cyclin E-Mutanten und die prozentuale Verteilung auf die Zellzyklusphasen G₁ und S/G₂. Der Versuch wurde mit allen Mutanten mehrfach mit demselben Ergebnis, unter anderem in HeLa-Zellen, und mit pEGFP-N3-Konstrukten wiederholt.

2.2.3 Funktionsanalyse von Cyclin E-Mutanten in *S.cerevisiae*

In der Hefe *S. cerevisiae* sind weitere charakteristische Eigenschaften von humanem Cyclin E untersucht worden. So ist aus verschiedenen Experimenten bekannt, daß humanes Cyclin E bei starker Überexpression toxisch für verschiedene Hefestämme ist (Mumberg, 1995; Sewing, *et al.*,

1994) und daß es eine letale *cln1,2,3*-Mutation in der Hefe aufheben kann (Koff, *et al.*, 1991; Lew, *et al.*, 1991; Mumberg, 1995). Um das Vorhandensein dieser Charakteristika des Wildtyp-Proteins auch an den Mutanten-Proteinen zu untersuchen, wurden die entsprechenden cDNAs in den regulierbaren Hefeexpressionsvektor pRS416Met25 (Mumberg, *et al.*, 1994; Mumberg, *et al.*, 1995) kloniert. In Hefen transformiert verleiht dieser Vektor die Fähigkeit unter Uracil-Mangel zu wachsen. Außerdem wird die Expression des gewünschten Proteins durch das Vorschalten des Met25-Promotor vor die cDNA gesteuert, welcher durch die im Medium vorhandenen Menge an Methionin reguliert wird. In allen folgenden Hefexperimenten wurde der Vektor pRS415Met25 als Negativkontrolle eingesetzt, nach dessen Transformation keine Kolonien auftraten, da er nur Wachstum auf Leucin-defizienten Nährböden ermöglicht und nicht auf Uracil-defizienten-Selektivagarplatten.

Um die funktionellen Fähigkeiten der Cyclin E-Mutanten zu untersuchen wurden die entsprechenden pRS416Met25-Cyclin E-Plasmide in einen „triple *cln*“-mutanten Hefestamm transformiert (s. 5.10.2). Dazu wurde der Hefestamm Δ L1 (von S.I. Reed, Scripps Research Institute LaJolla, USA, zur Verfügung gestellt) verwendet, mit dessen Hilfe ursprünglich die humanen Cyclin A, D1 und E isoliert und als *cln1,2,3*-Komplementatoren identifiziert worden waren (Lew, *et al.*, 1991). Dabei handelt es sich um eine konditional letale Mutante, die auf Grund der deletierten CLN-Gene und eines genomisch integrierten CLN2-Gens unter der Kontrolle des GAL1-Promotors nur auf Galaktose-, nicht aber auf Glucose-haltigen Nährmedien wachsen kann. Wie in Abb. 16 zu sehen, konnte das Cyclin E_{wt}-Konstrukt die *cln1,2,3*-Mutation wie erwartet komplementieren, während die Leervektorkontrolle nur die Fähigkeit auf Uracil-defizienten Platten zu wachsen transferierte, jedoch kein Wachstum auf Glucose-haltigen Nährböden ermöglichte. Die recht hohe Konzentration von 1 mM Methionin reprimiert die Expression der eingebrachten Cyclin E-cDNA zwar so stark, daß keine toxischen Effekte zu sehen sind, ermöglicht aber dennoch eine basale Expression, die ausreicht um die *cln1,2,3*-Mutation zu komplementieren. Für die zu untersuchenden Mutanten ergibt sich ein Bild, das dem zentralen Teil des Proteins die wichtige Eigenschaft der funktionellen Aktivierung der Hefe-Cdks zuordnet. Die Mutanten, die nur geringe N- oder C-terminale Deletionen aufweisen sind in diesem System noch funktionell aktiv, während größere terminale bzw. interne Deletionen diese Eigenschaft verschwinden lassen. Interessanterweise ist auch die Punktmutante Cyclin E-R130A nicht mehr in der Lage das Fehlen der endogenen Hefe-Cycline zu kompensieren, da die Punktmutation offensichtlich eine effiziente Bindung und Aktivierung der Hefe-Cdks unmöglich macht und damit die publizierten experimentellen Daten aus höheren eukaryontischen Zellen (Clurman, *et al.*, 1996) bestätigt.

Außerdem ist zu bemerken, daß auch in diesem Hefestamm die durch Methioninmangel induzierbare starke Überexpression des Cyclin E_{wt}-Proteins und einiger der Cyclin E-Mutanten toxisch ist (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigt sich jedoch, daß die N-terminal deletierten Mutanten von Cyclin E, die noch eine Aufhebung des *cln1,2,3*-Phänotyps bewirken, nicht toxisch wirken. In diesem genetischen Hintergrund scheint der N-terminale Proteinanteil also einen wesentlichen Beitrag zur Toxizität des Proteins zu leisten und die beiden Eigenschaften der Toxizität und der funktionellen Komplementation voneinander zu trennen.

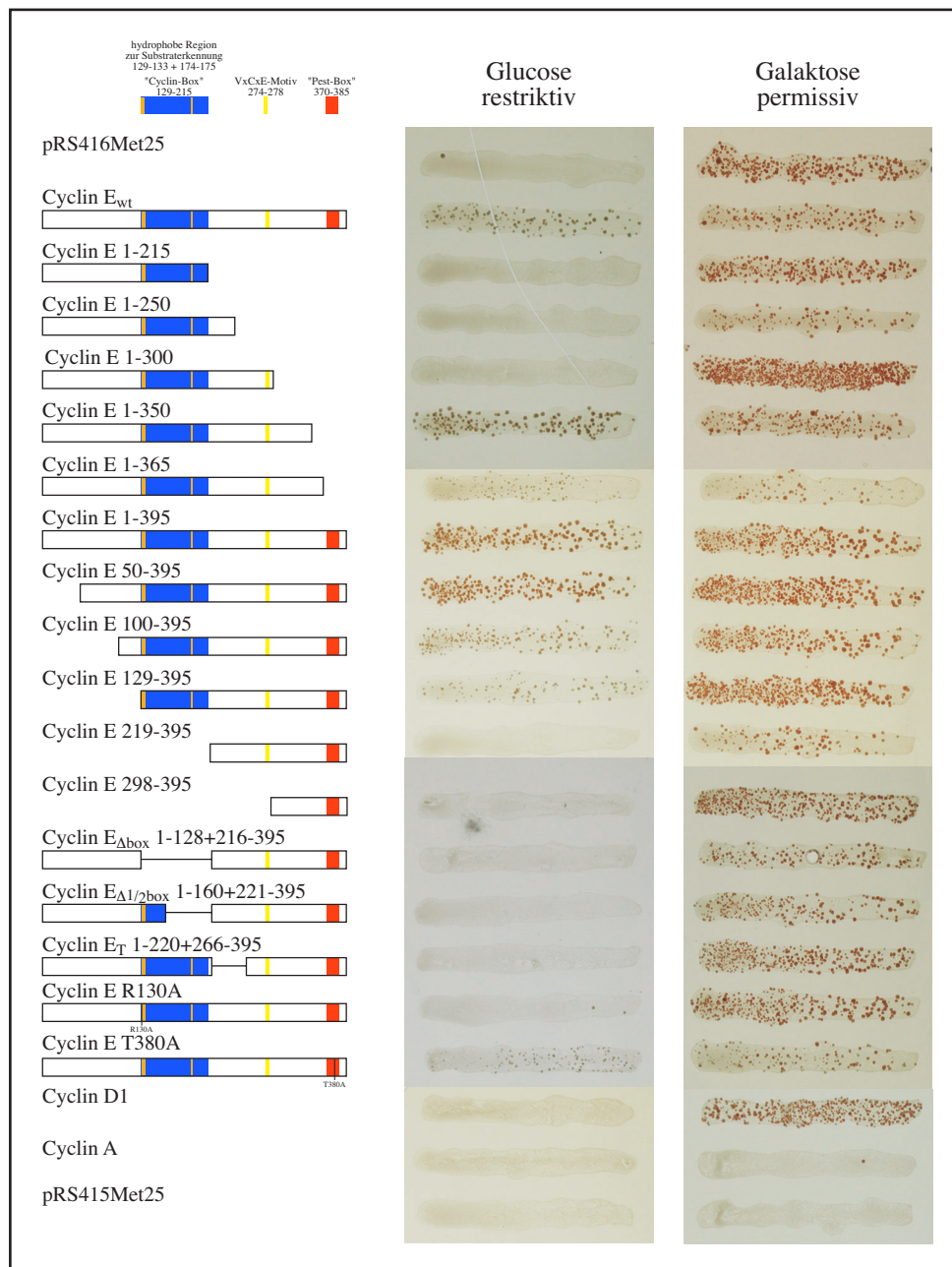


Abb. 16: Analyse der Komplementation der *cln1,2,3* Defizienz in *S. cerevisiae* durch Cyclin E-Mutanten.

Der Hefestamm $\Delta L1$ wurde mit pRS416Met25-Expressionsvektoren für die angegebenen Cycline bzw. Cyclin E-Mutanten transformiert und anschließend ein Teil des Versuchsansatzes parallel auf Galaktose- bzw. Glucosehaltigen Selektivagarplatten, die beide 1mM Methionin enthielten, ausgestrichen. Die Platten wurden für 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Unter permissiven Bedingungen (Galaktose) wuchsen in allen Ansätzen (außer Cyclin A und Negativkontrolle pRS415Met25) Hefekolonien, während unter restriktiven Bedingungen (Glucose) der komplementierende Effekt der Cyclin E-Expression durch Wachstum sichtbar wird. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von 3 Wiederholungen.

Die Positivkontrollen in diesem Experiment waren die Expression von Cyclin D1 und Cyclin A, denen die gleichen komplementierenden Eigenschaften wie Cyclin E zugeschrieben werden (Lew, *et al.*, 1991). Jedoch konnte für Cyclin D1 unter diesen Versuchsbedingungen keine Komplementation des *cln1,2,3*-Phänotyps gefunden werden. Weiterhin konnten mit dem erstellten pRS416Met25-Cyclin A-Konstrukt keine positiv transformierten Hefekolonien etabliert werden. Ob es sich bei diesen beiden Phänomenen um ein Problem der Expressionstärke handelt konnte nicht experimentell geklärt werden, ist aber naheliegend.

Zur Kontrolle der korrekten Expression der untersuchten Cyclin E-Mutanten-cDNAs wurden Flüssigkulturen einzelner positiv transformierter Klone des Δ L1-Hefestammes angelegt. Die Extrakte dieser Hefekulturen wurden einer Immun Blot-Analyse unterzogen (s. 5.9.10). Dabei konnten unter reprimierenden Bedingungen (1 mM Methionin) nur geringe Mengen des zu untersuchenden Wildtyp-Cyclin E gefunden werden, so daß für den Nachweis der Mutanten-Proteine die heterologe Proteinexpression durch einen Wechsel auf Methionin-freies Selektivmedium für 6 h induziert wurde. Wie in Abb. 17 zu sehen konnten alle fraglichen Cyclin E-Mutanten-Proteine mit den korrekten, erwarteten, relativen molekularen Größen in etwa gleichen Mengen durch Antikörper nachgewiesen werden.

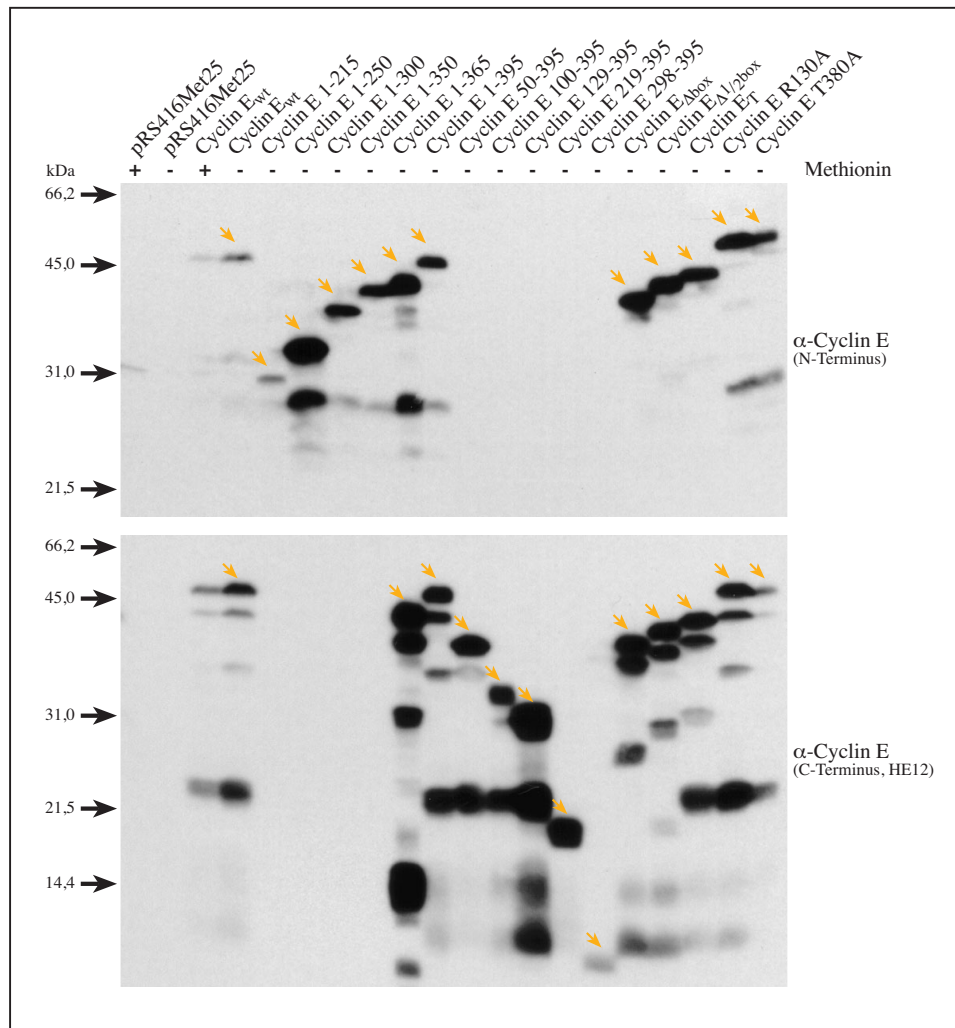


Abb. 17: Nachweis der Proteinexpression der Cyclin E-Mutanten in *S. cerevisiae*.

Gesamtproteinextrakte aus Δ L1-Hefen, transformiert mit pRS416Met25-Expressionsplasmiden für Cyclin E-Mutanten wurden durch Immun Blot auf das Vorhandensein der Cyclin E-Mutanten-Proteine hin analysiert. Als Antikörper wurden α -Cyclin E (HE12) gegen den C-Terminus und α -Cyclin E (N-term) gegen den N-Terminus eingesetzt. Die spezifischen Banden der einzelnen Mutanten sind durch Pfeile markiert.

Um eine mögliche Interferenz mit dem Phänotyp der *cln1,2,3*-mutierten Δ L1-Zellen zu vermeiden, wurden die weiteren Untersuchungen zur Toxizität von Cyclin E in dem Wildtyp-*S. cerevisiae*-Stamm YPH 499 durchgeführt. Wie in Abb. 18 zu sehen, konnten unter den Met25-Promotor nicht reprimierenden Bedingungen keine Hefen wachsen, die das Plasmid mit der Cyclin E_{wt}-cDNA trugen, während die Zellen mit dem Leervektor oder mit dem Kontrollplasmid

für Cyclin D1 deutliche Kolonien bildeten. Weiterhin zeigte sich für die Mutanten von Cyclin E, daß die Mehrzahl keine toxische Eigenschaft in der Wildtyp-Hefe aufweist. Einige nur gering veränderte Deletionsmutanten und die Punktmutante Cyclin E T380A sind wie erwartet ebenso toxisch sind wie der Wildtyp und lassen kein Wachstum zu.

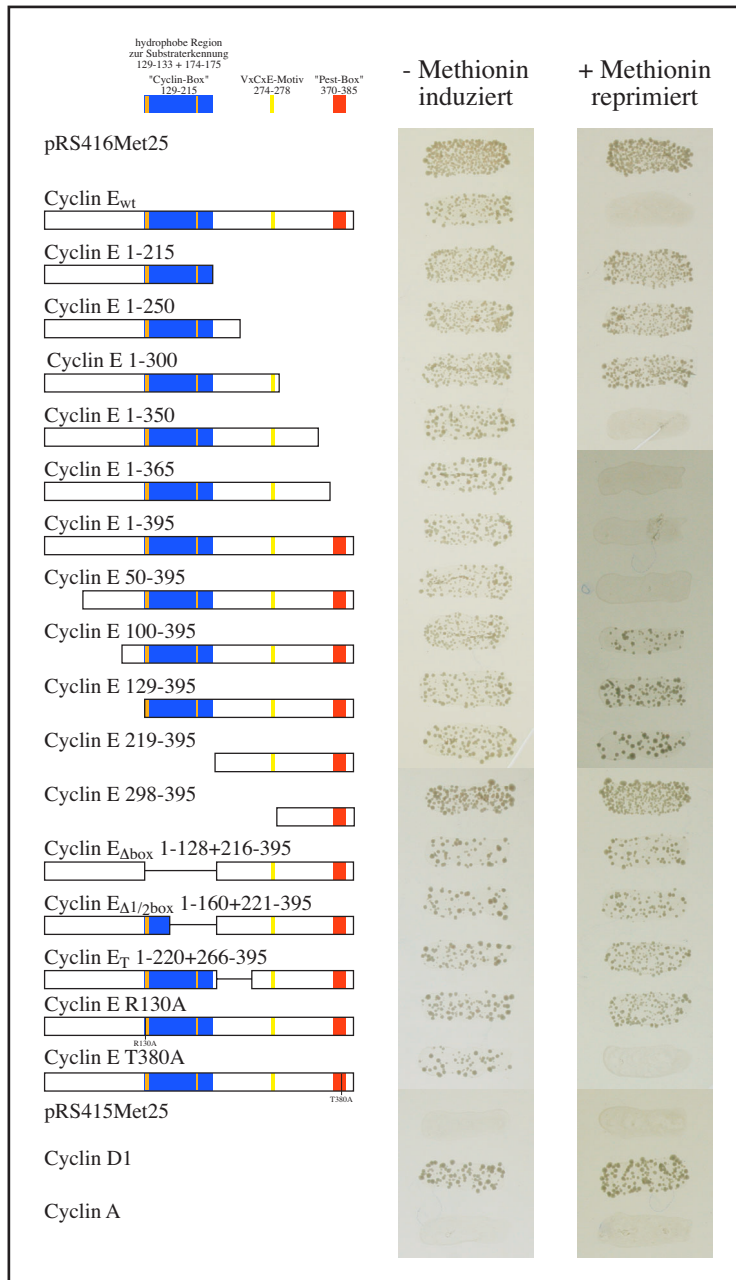


Abb. 18: Analyse der Toxizität von Cyclin E-Mutanten in *S. cerevisiae*.

Hefen des Stammes YPH499 wurden mit regulierbaren Expressionsplasmiden für Cyclin E-Mutanten transformiert und direkt auf Selektivagarplatten ausgestrichen. Nach 3-5 Tagen Inkubation bei 30 °C waren Kolonien sichtbar. Unter reprimierenden Bedingungen (1 mM Methionin) wuchsen in allen Ansätzen Hefekolonien, während unter induktiven Bedingungen (ohne Methionin) der toxische Effekt der Cyclin E-Expression durch fehlendes Wachstum sichtbar wird. Ein repräsentatives Experiment aus 5 Wiederholungen ist gezeigt.

Interessanterweise verhinderte das als Kontrolle transformierte pRS416Met25-Cyclin A-Plasmid auch in diesem Hefestamm das Auswachsen von Kolonien. Daher ist von einem generellen toxischen Effekt dieses Plasmids auszugehen, der jedoch nicht weiter aufgeklärt werden konnte.

Abschließend kann festgestellt werden, daß die Funktionalität und Toxizität der untersuchten Cyclin E-Mutanten in der Hefe weitestgehend überlappen. Jedoch stimmen die hierbei beobachteten Eigenschaften nicht mit allen in anderen Systemen ermittelten Charakteristika der mutanten Cyclin E-Proteine überein (s. Abb. 19).

Die in 2.2 gefundenen Eigenschaften der Cyclin E-Mutanten sind in Abb. 19 nochmals zusammenfassend dargestellt.

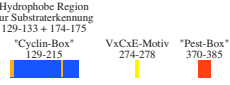

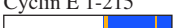
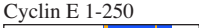










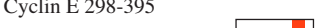
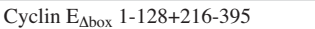
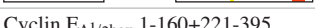

	onkogenes Transformationspotential	Fähigkeit zur Induktion der Zellzyklusbeschleunigung	Komplementation von cln1,2,3 mutanten Hefen	Toxizität in Hefen
Cyclin E _{wt} = 1-395 	+	+	+	+
Cyclin E 1-215 	-	-	-	-
Cyclin E 1-250 	-	-	-	-
Cyclin E 1-300 	-	-	-	-
Cyclin E 1-350 	+	-	+	+
Cyclin E 1-365 	+	+	+	+
Cyclin E 1-395 	+	+	+	+
Cyclin E 50-395 	+	+	+	+
Cyclin E 100-395 	+	-	+	-
Cyclin E 129-395 	+	-	+	-
Cyclin E 219-395 	-	-	-	-
Cyclin E 298-395 	-	-	-	-
Cyclin E _{Δbox} 1-128+216-395 	+	-	-	-
Cyclin E _{Δ1/2box} 1-160+221-395 	+	-	-	-
Cyclin E _T 1-220+266-395 	+	-	-	-
Cyclin E R130A 	-	-	-	-
Cyclin E T380A 	+	+	+	+

Abb. 19: Zusammenfassung der Ergebnisse von 2.2.

Die Eigenschaften der Cyclin E-Mutanten werden gegenübergestellt. Allgemein kann festgestellt werden, daß der zentrale Teil des Cyclin E-Proteins von AS 100 bis AS 350 für fast alle untersuchten Eigenschaften von Bedeutung ist. Werden interne Deletionen oder größere terminale Deletionen vorgenommen, so verlieren die entstehenden Proteine die meisten ihrer Funktionen *in vivo*.

2.3 Identifikation der Interaktionsfähigkeit von Cyclin E-Mutanten mit Partnerproteinen

2.3.1 *In vitro* Interaktion von Cyclin E-Mutanten mit Cdk2 und p27^{Kip1}

Um die Interaktionsfähigkeit der Cyclin E-Mutanten mit Cdk2 und CKIs zu untersuchen, sollten die *in vitro* mit ihren Partnerproteinen mögliche Komplexbildung analysiert werden. Dazu mußten die Cyclin E-Mutanten *in vitro* translatiert und ihre Partner rekombinant hergestellt werden. Die *in vitro* Translation erwies sich in dem zunächst verwendeten Klonierungsvektor pBluescript KS mit Hilfe der T3- und T7-Promotoren als wenig effizient. Der Wechsel zu dem für die *in vitro* Translation optimierten Vektor pSP64polyA ergab deutlich größere Mengen an [³⁵S]-Methionin

markierten Proteinen (Daten nicht gezeigt). Alle Cyclin E-Mutanten wurden in diesen Vektor kloniert und in Gegenwart von ^{35}S -Methionin *in vitro* translatiert. Dies ergab jeweils ^{35}S -Methionin-markierte Proteine des erwarteten relativen Molekulargewichts (s. Abb. 20).

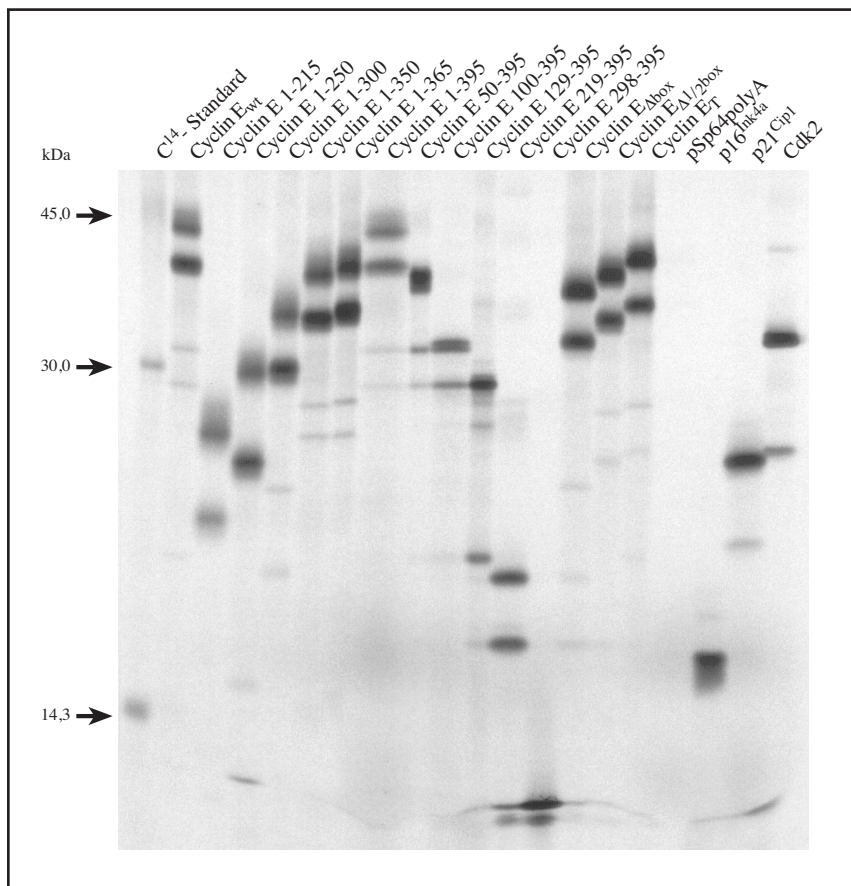


Abb. 20: *In vitro* Translation von Cyclin E-Mutanten.

Cyclin E-Mutanten wurden mit dem Vektor pSP64polyA *in vitro* translatiert und anschließend durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch Exposition eines Röntgenfilms wurden die durch den Einbau von ^{35}S -Methionin markierten Proteine sichtbar.

Um die Partnerproteine von Cyclin E: Cdk2, p21^{Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2} rekombinant herzustellen wurde das Baculovirus-Expressionssystem (s. 5.9.7) gewählt. Die cDNAs der vier Proteine wurden PCR-amplifiziert und im korrekten Leserahmen in den Vektor pBlueBacHisA kloniert, so daß ein Fusionsprotein mit N-terminalem „RGS-6xHis-tag“ entstand. Die klonierten cDNAs und der Übergang zur N-terminalen, durch den Vektor kodierten „His-tag“-Sequenz wurden durch Sequenzanalyse (s. 5.8.16) überprüft und als korrekt identifiziert. Mit Hilfe dieser Vektoren wurden rekombinante Viren hergestellt die in Sf9-Zellen die Expression der gesuchten Proteine induzierten (Daten nicht gezeigt). Nach Herstellung von Virusstammlösungen wurden mehrfach größere Mengen an Sf9-Zellen infiziert und aus deren Zellextrakten die „6xHis“-markierten Proteine aufgereinigt (s. 5.9.8). Dies gelang nur für Cdk2 und p27^{Kip1} in befriedigender Weise, so daß rekombinantes Protein in reiner Form und in größeren Mengen vorlag (s. Abb. 21 & 22). Weitere Versuche die vier Proteine in Bakterien mit Hilfe des Vektors pQE30 aus dem „His-Tag“-System zu exprimieren und aufzureinigen, gelangen, auf Grund der zu geringen Expression der gesuchten Proteine in *E. coli*, nicht.

Die Interaktion der Cyclin E-Mutanten mit Cdk2 und p27^{Kip1} *in vitro* wurde nach dem Mischen der potentiellen Bindungspartner durch Ko-Immunpräzipitationen der entstehenden Proteinkomplexe analysiert (s. Abb. 21 & 22).

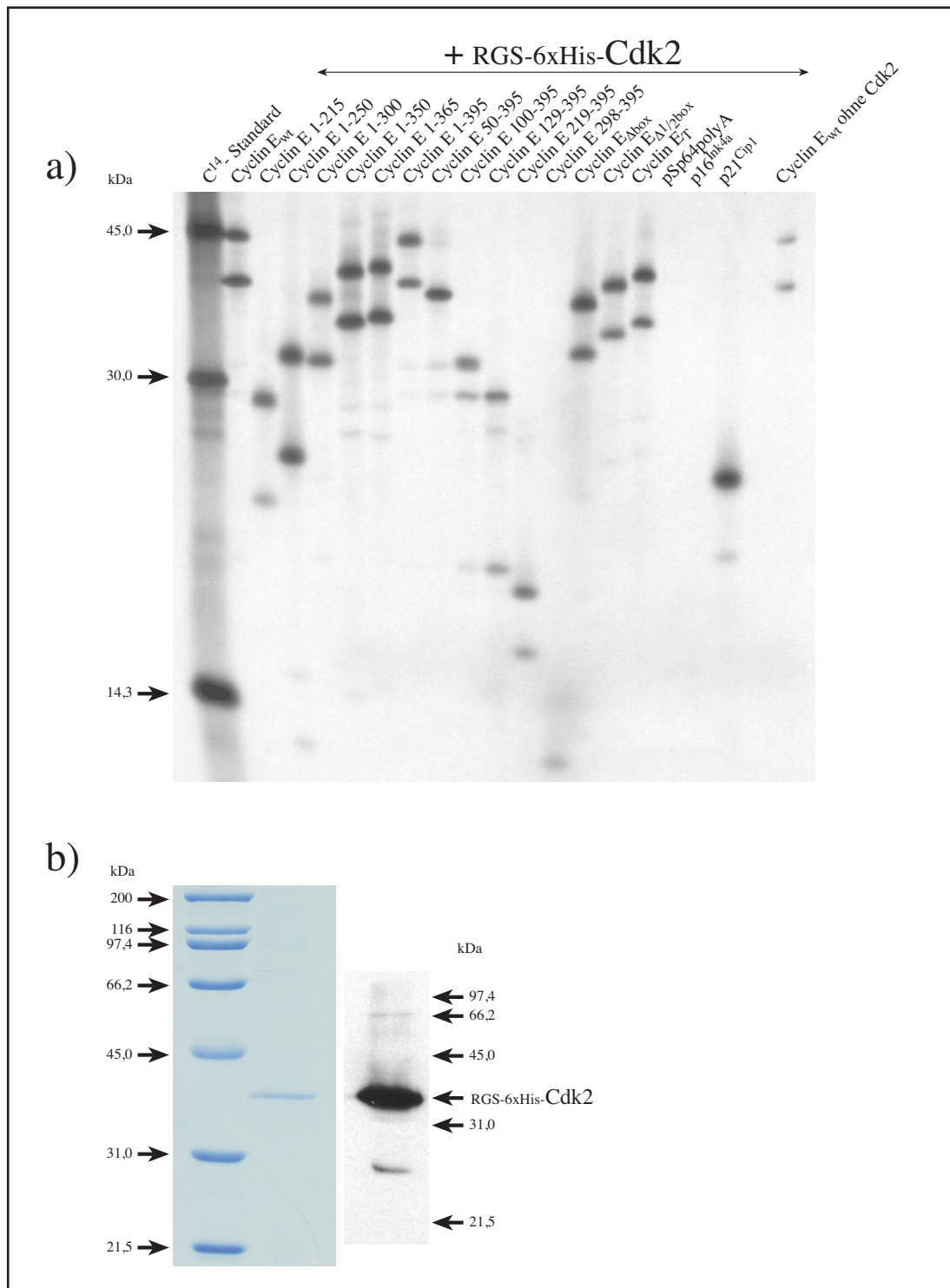


Abb. 21: Immunpräzipitation von *in vitro* translatierten Cyclin E-Mutanten und RGS-6xHis-Cdk2.

a) Die in Abb. 20 dargestellten *in vitro* translatierten Proteine wurden mit RGS-6xHis-Cdk2 gemischt, mit α -Cdk2 immunpräzipitiert und nach SDS-Gelelektrophorese durch Exposition eines Röntgenfilms visualisiert. Das aufgereinigte RGS-6xHis-Cdk2-Protein ist in b) sowohl im Coomassie-Blau gefärbten SDS-Gel, als auch in der Immun Blot Kontrolle mit α -RGS-6xHis-Antikörper gezeigt.

Dabei wurden als Kontrollen *in vitro* Translatate der Proteine p16^{Ink4a}, p21^{Cip1} und Cdk2 eingesetzt, während die beiden Punktmutanten Cyclin E R130A und - T380A in diesen Versuchen nicht verwendet wurden.

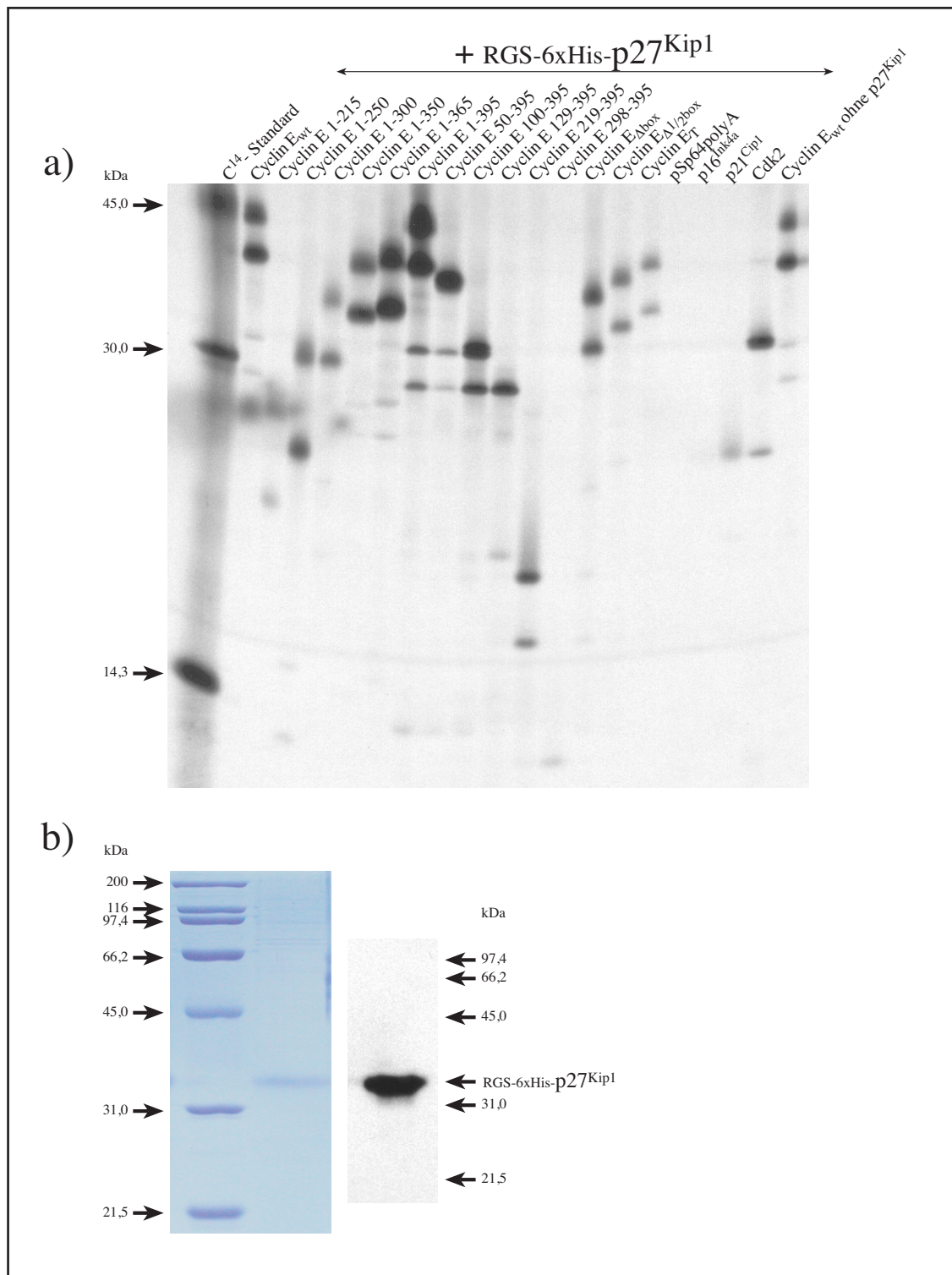


Abb. 22: Immunpräzipitation von in vitro translatierten Cyclin E-Mutanten und RGS-6xHis-p27^{Kip1}.

a) Die in Abb. 20 dargestellten *in vitro* translatierten Proteine wurden mit RGS-6xHis-p27^{Kip1} gemischt, mit α -p27^{Kip1} immunpräzipitiert und nach SDS-Gelelektrophorese durch Exposition eines Röntgenfilms visualisiert. Das aufgereinigte RGS-6xHis-p27^{Kip1}-Protein ist in b) sowohl im Coomassie-Blau gefärbten SDS-Gel, als auch in der Immun Blot Kontrolle mit α -RGS-6xHis- Antikörper gezeigt.

Alle untersuchten Cyclin E-Mutanten konnten sowohl Cdk2 als auch p27^{Kip1} unter den Versuchsbedingungen binden (s. Abb. 21 & 22). Aus den Negativkontrollen mit p16^{Ink4a} und unprogrammiertem *in vitro* Translatat wurde kein Protein präzipitiert. Ebenso ist die Präzipitation

der Positivkontrolle durch *in vitro* translatiertes p21^{Cip1} bzw. Cdk2 in beiden Fällen gelungen, was die Spezifität der Antikörper und des Versuchsansatzes bestätigt.

Dennoch ist die Präzipitation aller Cyclin E-Mutanten, wenn auch teilweise in geringem Maße, erstaunlich, vor allem da die „Cyclin-Box“ defizienten Mutanten noch Cdk2 zu binden scheinen, was nach bislang bekannten Untersuchungen nicht möglich sein sollte. Eine Klärung der Spezifität der Immunpräzipitationen durch den Einsatz der Cdk2-Bindungs defizienten Punktmutante Cyclin E R130A wäre notwendig.

Weiterhin wurden Ko-Immunpräzipitationsversuche mit den nicht ausreichend sauber aufgereinigten Proteinen RGS-6xHis-p21^{Cip1} und RGS-6xHis-p57Kip2 durchgeführt, die ähnliche Ergebnisse erbrachten wie die oben genannten (Daten nicht gezeigt). Es konnte keine spezifische Interaktion einzelner Cyclin E-Mutanten beobachtet werden, während die Kontrolle mit Cdk2 und p16^{Ink4a} funktionierten. Auch mit GST-p45^{Skp2} konnte keine spezifische Interaktion nachgewiesen werden, obwohl das Protein ausreichend rein dargestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Generell müßten die Versuchsbedingungen soweit optimiert werden, daß eine selektive Kopräzipitation möglich ist, jedoch erwiesen sich Versuche mit größeren Anteilen von Detergentien zur Erhöhung der Stringenz als nicht effektiv. Abschließend kann nur festgestellt werden, daß es sich bei Cyclin E um ein Protein handelt, dessen Bindungen an Partnerproteine wie z.B. Cdk2 sehr stark zu sein scheinen und nicht nur auf einer einzelnen Domäne beruhen, da alle Deletionsmutanten in diesem System noch ein gut detektierbares Bindungspotential aufweisen.

2.3.2 *In vitro* Aktivierung von Cdk2 durch Cyclin E-Mutanten

Die Aktivierung von Cdk2 durch Cyclin E wurde *in vitro* durch Kombination der aufgereinigten Kinase aus dem Baculovirus-System mit *in vitro* translatierten Cyclin E-Mutanten vorgenommen. An eine Immunpräzipitation wurde eine Analyse der Kinaseaktivität mit dem Substrat Histon H1 und radioaktivem ³²P-γ-ATP angeschlossen. Eine Immunpräzipitation mit α-Cdk2-Antikörper ergab nur eine sehr geringe Erhöhung der präzipitierbaren Kinaseaktivität nach Zugabe von *in vitro* translatiertem Cyclin E im Verhältnis zur Kontrolle mit unprogrammiertem *in vitro* Translatat bzw. ganz ohne Zusatz. Allerdings konnte festgestellt werden, daß diese geringe Erhöhung der Kinaseaktivität nur bei Cyclin E_{wt} bzw. Cyclin E 1-395 und den Mutanten Cyclin E 1-365 und 50-265 auftrat (Daten nicht gezeigt). Bei einer Immunpräzipitation gegen den C-Terminus von Cyclin E, konnten zwar nicht alle Mutanten analysiert werden, jedoch ergab sich eine wesentlich erhöhte Kinaseaktivität im Verhältnis zu den Kontrollen (s. Abb. 23). In diesem Versuch konnte ebenfalls nur das Wildtyp Cyclin E-Protein, sowie die interne Kontrolle Cyclin E 1-395 und die N-terminal deletierte Mutante Cyclin E 50-395 eine Aktivierung der Cdk2-Kinaseaktivität hervorrufen. Die Eigenschaften der C-terminal deletierten Mutanten konnten auf Grund der Spezifität des Antikörpers nicht untersucht werden. Die beiden Punktmutanten Cyclin E R130A und - T380A wurden in diesen Experimenten nicht eingesetzt.

Die niedrige Kinaseaktivität nach Immunpräzipitation mit α-Cdk2-Antikörper ist möglicherweise auf eine sterische Behinderung der Kinasereaktion durch den gebundenen Antikörper zurückzuführen. Um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen, sollte ein besseres Substrat als Histon H1 verwendet werden. Dazu wurde ein Oligodesoxynukleotid, das für ein Peptid kodiert,

welches von Cdk2/Cyclin A erkannt und phosphoryliert wird (s. 7.1) (Brown, *et al.*, 1999), an die cDNA für das Maltose bindende Protein (MBP) in den Vektor pMal-p2 kloniert.

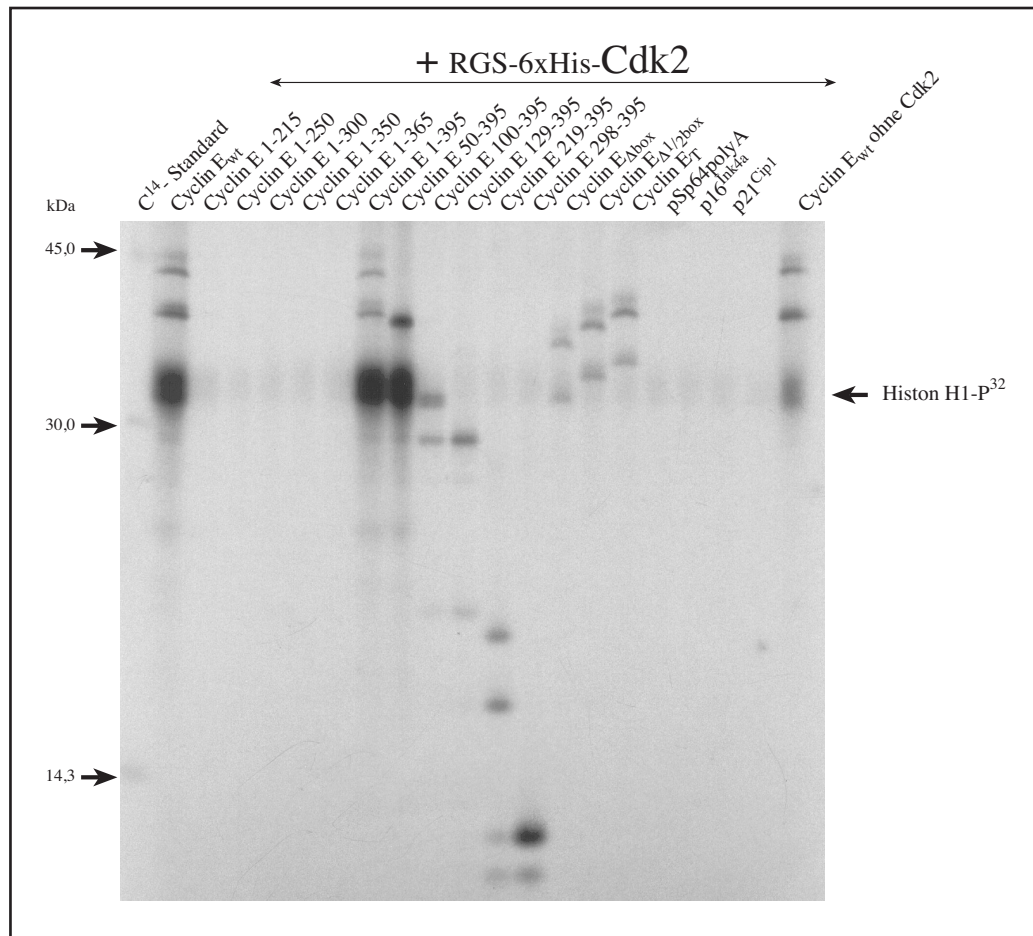


Abb. 23: Untersuchung der *in vitro* Kinaseaktivierung durch Cyclin E-Mutanten.

Die in Abb. 20 dargestellten *in vitro* translatierten Proteine wurden mit RGS-6xHis-Cdk2 gemischt, mit α -Cyclin E (C-19) immunpräzipitiert, die präzipitierten Komplexe in einem Kinase-Assay eingesetzt und dessen Ergebnis nach SDS-Gelelektrophorese durch Exposition eines Röntgenfilms visualisiert.

Das MBP-Peptid-Fusionsprotein wurde in *E. coli* exprimiert und über ein 6xHis-tag aufgereinigt. Es konnte sowohl das wt-MBP, als auch die Fusionen mit dem Substratpeptid bzw. einer nicht phosphorylierbaren Punktmutante (Austausch des zu phosphorylierenden Threonin gegen Alanin) des Peptids aufgereinigt werden. Zwar konnte im *in vitro*-Kinase-Assay eine geringe Kinasierung des Substratpeptids, bei fehlender Kinasierung der Punktmutante beobachtet werden, doch waren die beobachteten Signale eher schwächer als die gleichzeitig mit Histon H1 erhaltenen. Eine Verbesserung der Sensitivität war also nicht erreicht worden, weshalb weiterhin mit Histon H1 als Substrat gearbeitet wurde.

2.3.3 *In vivo* Analyse der Interaktionen von Cyclin E mit dem 2-Hybrid-System

Um die Interaktion von Cyclin E-Mutanten mit anderen Proteinen weiter zu untersuchen, wurde das 2-Hybrid-System eingesetzt. Die cDNAs der zu untersuchenden Proteine mußten dazu in die Vektoren pM bzw. pVP16 kloniert werden. Diese wurden durch Ligation von zwei kompletären Oligodesoxynukleotiden (s. 7.1) die für verschiedene Restriktions-endonuklease-Schnittstellen

kodieren modifiziert, so daß die Vektoren pM-MCSnew und pVP16-MCSnew mit veränderten multiplen Klonierungsstellen erhalten wurden (Karten s. 7.1). In diese wurden PCR-amplifizierte cDNAs der Cyclin E-Mutanten kloniert, sowie weitere cDNAs zu Kontrollzwecken. Die korrekte Expression der Cyclin E-VP16-Hybridproteine wurde durch Immun Blot-Analyse kontrolliert (s. Abb. 24 a). Alle Cyclin E-Proteine wurden in etwa gleichen Mengen exprimiert. Es ist zu bemerken, daß sich das relative Molekulargewicht der Hybridproteine verhältnismäßig zu den „normalen“ unfusionierten Proteinen nicht nur um die rechnerischen ca. 13 kDa der VP16-Domäne veränderte, sondern sich Unterschiede von 25-50 kDa ergaben. Anscheinend bedingt die saure VP16-Domäne ein verändertes Laufverhalten im SDS-Polyacrylamidgel und führt so zu stärkeren Veränderungen im beobachteten relativen Molekulargewicht. Weiterhin wurde die Expression, der zu Kontrollzwecken verwendeten Cyclin D1-, p16^{Ink4a}-, p21^{Cip1}-, GFP- und Gal4-VP16-Fusionen durch Immun Blot mit α -VP16-Antikörper überprüft. Dabei konnten neben Cyclin E-VP16 nur die Fusionsproteine Cyclin D1-VP16, p16^{Ink4a}-VP16, p21^{Cip1}-VP16 detektiert werden (s. Abb. 24 b). Da die Luziferasetests eine eindeutige Wirkung der Positivkontrolle ergaben (s. Abb. 25, 26 & 27), was nur möglich ist, wenn das hybride Protein aus Gal4-dbd und VP16-Transaktivierungsdomäne (pM3VP16) auch exprimiert wird, ist die fehlende Detektion im Immun Blot nicht direkt zu erklären.

In den Vektor pM bzw. in den homolog zu pVP16-MVCSnew mit einer neuen multiplen Klonierungsstellen versehenen Vektor pM-MCSnew wurden verschiedene cDNAs kloniert, die für bekannte Interaktionspartner von Cyclin E kodieren und somit als Köderproteine für den Interaktionstest fungieren konnten. Mit diesen Plasmiden konnten in den zu transfizierenden Zellen Fusionsproteine aus der Gal4-dbd und dem interagierenden Protein generiert werden. Um verschiedene Interaktionen der Cyclin E-Mutanten zu untersuchen wurden die cDNAs von Cdk2, p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip1}, p45^{Skp2}, Cullin 1 und E2F-1, sowie für Kontrollen Cdk4 und p16^{Ink4a} im korrekten Leserahmen in die pM-Vektoren kloniert. Außerdem stand das Plasmid p130-Gal4-pcDNA3 (J. Nevins, Duke Univ. Durham, NC, USA (Meloni, *et al.*, 1999)), als Köder zur Verfügung.

Die Interaktionsanalyse ergab, daß Cyclin E mit Cdk2 in diesem System interagiert und daß diese Interaktion sehr stark ist, denn es wurden Werte erreicht, die im Bereich der Positivkontrolle liegen, bei der VP16-Transaktivierungsdomäne und Gal4-DNA-Bindungsdomäne direkt aneinander fusioniert sind (pM3VP16) (s. Abb. 25 a). Von den Cyclin E-Mutanten können nur die Deletionsmutanten Cyclin E 1-350, - 1-365, - 50-395, - 100-395 und - 129-395, sowie die Punktmutante Cyclin E T380A in unterschiedlichen Abstufungen mit Cdk2 interagieren. Für die Bindung von p21^{Cip1} ergibt sich ebenso wie für p27^{Kip1} ein homologes Bild (Abb. 25 b) & c). Dabei ist die Stärke der Interaktion deutlich geringer als für Cdk2, bewegt sich aber für die beiden CKIs im gleichen Bereich.

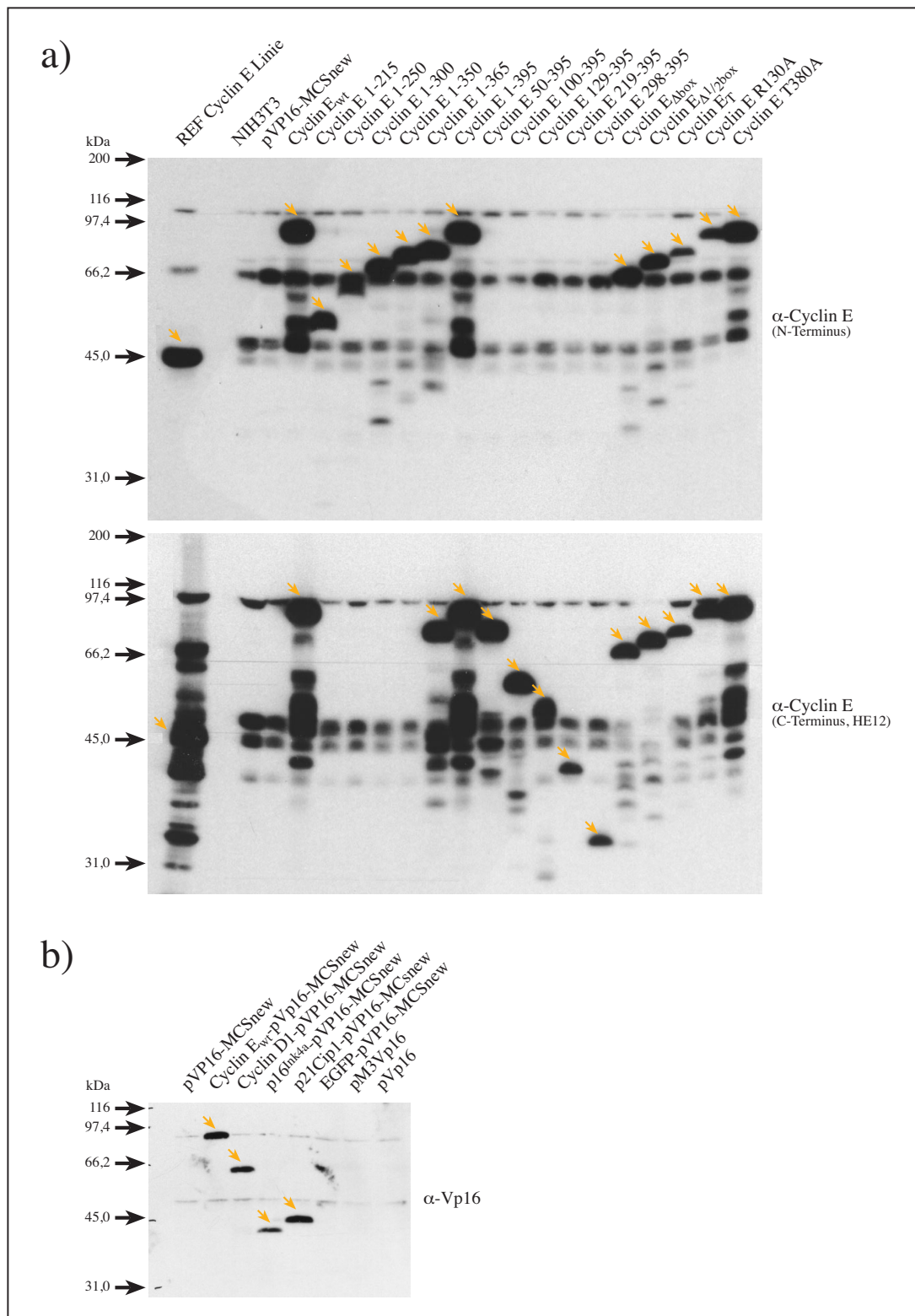


Abb. 24: Immun Blot-Expressionskontrolle von VP16-Hybridproteinen in HeLa-Zellen.

Die pVP16-MCSnew-Plasmide mit den angegebenen cDNAs wurden transient mit der $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Methode in HeLa-Zellen transfiziert und die Extrakte durch SDS-PAGE und anschließendem Immun Blot auf die Expression der **a)** VP16 fusionierten Cyclin E-Mutanten mit den angegebenen α -Cyclin E-Antikörpern bzw. **b)** VP16-Fusionsproteine mit α -VP16-Antikörper hin überprüft.

In NIH3T3-Zellen wurden qualitativ die gleiche Resultate erzielt wie in HeLa-Zellen, jedoch waren die ermittelten RLUs in HeLa-Extrakten immer deutlich höher, was auf eine wesentlich bessere Effizienz bei der Transfektion (überprüft durch β -Galaktosidase-Färbung nach Transfektion von

pZeolacZ) von HeLa-Zellen gegenüber den NIH3T3-Zellen zurückzuführen ist. Der einzige qualitative Unterschied zwischen der Aktivierung des Reportergens in den Zelllinien ist, daß in HeLa-Zellen die Interaktion von Cyclin D1-VP16 mit Partnerproteinen immer relativ geringere Luziferaseaktivitäten hervorruft als in NIH3T3-Zellen. Möglicherweise ist dies auf die HPV-Transformation der HeLa-Zellen zurückzuführen, wodurch E6- und E7-Proteine exprimiert werden, die das endogene Gleichgewicht von Cdk4/Cyclin D1/p16^{Ink4a} so nachhaltig stören, daß die Überexpression von Cyclin D1 ebenfalls beeinflußt wird. Weiterhin konnte in allen Versuchen konsistent eine leichte Aktivierung des Reportergens nach Transfektion von p21^{Cip1}-pVP16-MCSnew beobachtet werden (s. Abb. 25, 26 & 27).

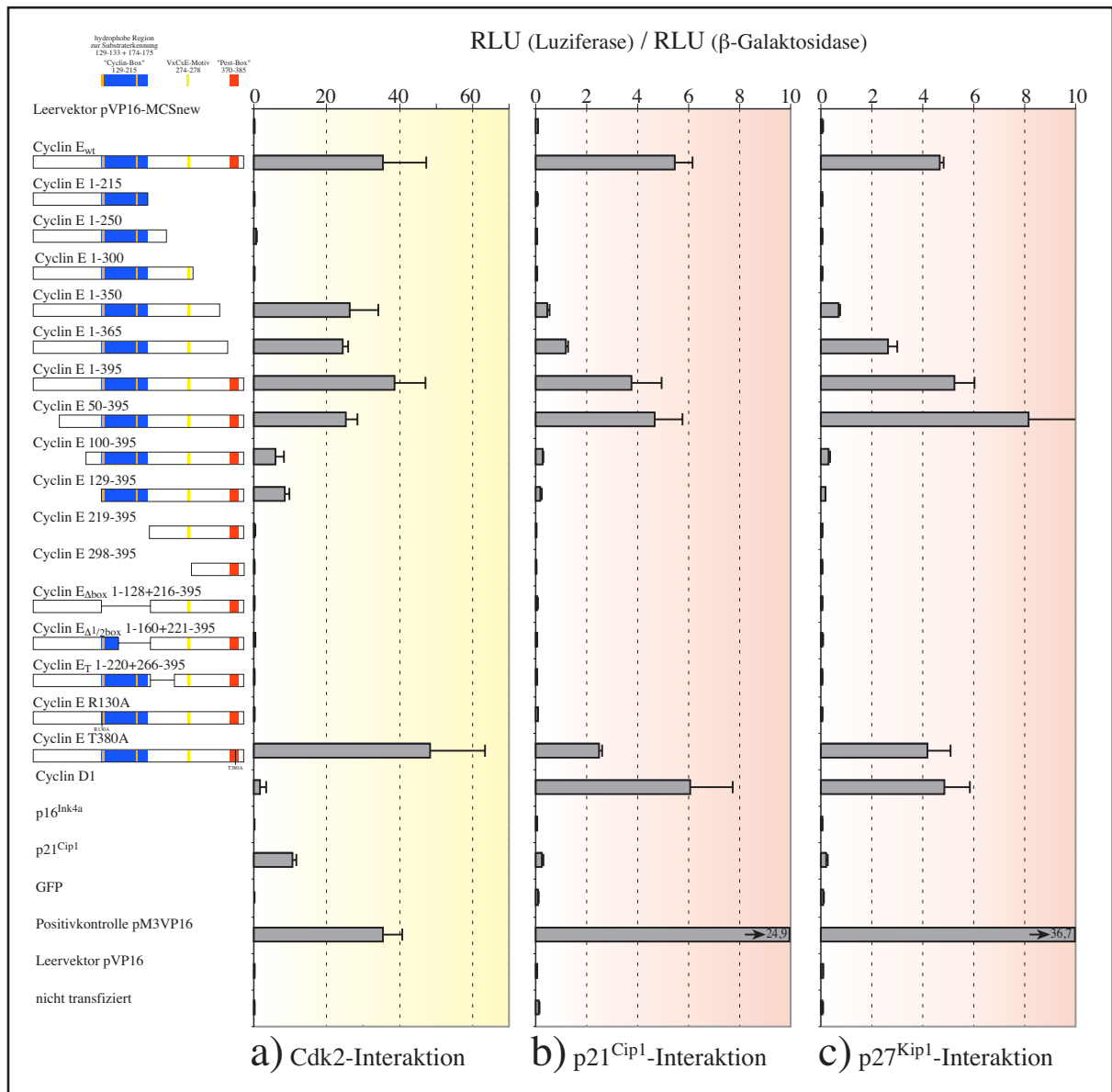


Abb. 25: Untersuchung der Interaktion von Cyclin E-Mutanten mit Cdk2, p21^{Cip1} bzw. p27^{Kip1} mit dem 2-Hybrid-System.

NIH3T3-Zellen wurden mit den angegebenen Vektoren für VP16-Hybridproteine und a) Cdk2-pM-MCSnew, b) p21^{Cip1}-pM-MCSnew, c) p27^{Kip1}-pM-MCSnew, sowie 5xGal4-E1b-luc und pZeolacZ transfiziert und anschließend die Aktivität von Luziferase und β-Galaktosidase luminometrisch analysiert. Als Einheit der Y-Achse sind relative Lichteinheiten (RLU) der Luziferase geteilt durch die RLU der als internen Standard transfizierten β-Galaktosidase angegeben. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte dreier Messungen mit den jeweiligen Fehlerbalken der Standardabweichungen eines Experiments. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei Wiederholungen (2x in NIH3T3- und 1x in HeLa-Zellen), die qualitativ alle gleiche Resultate lieferten.

Für die Interaktion mit den untersuchten drei Proteinen ist also der zentrale Bereich des Cyclin E-Proteins von AS 129 bis AS 350 notwendig, während Deletionen in der zentralen „Cyclin-Box“ eine Interaktion verhindern. Außerdem kann die fehlende Interaktion der Punktmutante Cyclin E R130A mit Cdk2 (Clurman, *et al.*, 1996) bestätigt werden. Interessanterweise bewirkt diese Mutation einer einzelnen Aminosäure innerhalb des Proteins auch einen vollkommenen Verlust der Interaktionsfähigkeit mit den CKIs, was eine kooperative Bindung von p21^{Cip1} bzw. p27^{Kip1} über Cdk2 an Cyclin E annehmen läßt. Allerdings bewirkt eine zusätzliche Kotransfektion von CMV-Plasmiden mit cDNAs für wt-Cdk2 bzw. wt-p21^{Cip1} oder wt-p27^{Kip1} keine Erhöhung der Reporteraktivität in den Versuchen mit Cyclin E_{wt}-VP16 und p21^{Cip1}-Gal4dbd, p27^{Kip1}-Gal4dbd bzw. Cdk2-Gal4dbd. Im Gegenteil, es wurden für diese Kombinationen reprimierende Effekte beobachtet (Daten nicht gezeigt). Dies spricht wiederum gegen eine kooperative Bindung von p21^{Cip1} oder p27^{Kip1} über Cdk2 an Cyclin E.

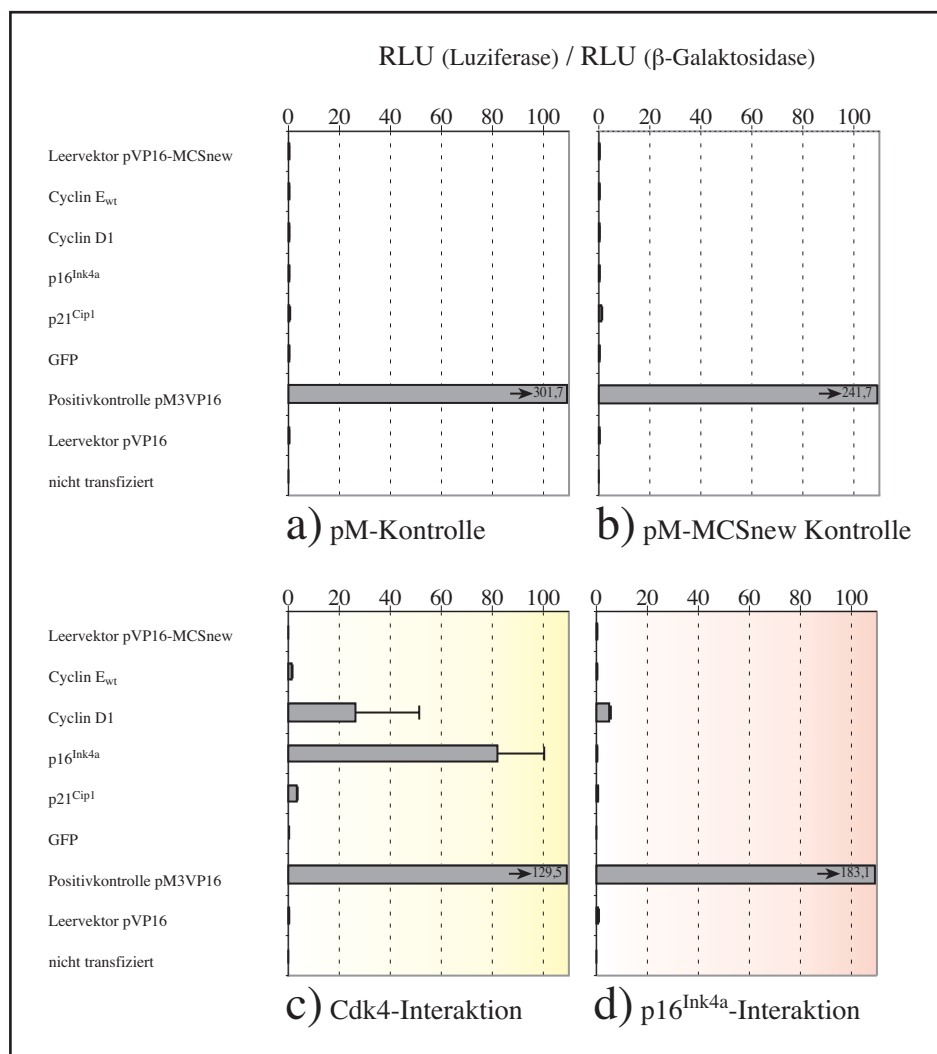


Abb. 26: Kontrolle der Spezifität der Interaktionen im 2-Hybrid-System.

NIH3T3-Zellen wurden mit den angegebenen Vektoren für VP16-Hybridproteine und a) pM, b) pM-MCSnew, c) Cdk4-pM, d) p16^{Ink4a}-pM sowie 5xGal4-E1b-luc und pZeolacz transfiziert und anschließend die Aktivität von Luziferase und β-Galaktosidase luminometrisch analysiert. Als Einheit der Y-Achse sind relative Lichteinheiten (RLU) der Luziferase geteilt durch die RLU der als internen Standard transfizierten β-Galaktosidase angegeben. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte dreier Messungen mit den jeweiligen Fehlerbalken der Standardabweichungen eines Experiments. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei Wiederholungen (2x in NIH3T3- und 1x in HeLa-Zellen), die qualitativ alle gleiche Resultate lieferten.

Um die Spezifität der Interaktionen im eingesetzten 2-Hybrid-System zu überprüfen, wurden Kontrollen mit dem Leervektor pM und dem modifizierten Leervektor pM-MCSnew durchgeführt (s. Abb.26 a) & b). Nur die Positivkontrolle pM3VP16 bewirkt eine Aktivierung des Reportergens bei Kotransfektion der Leervektoren, was eine unspezifische Aktivierung durch die Plasmide an sich ausschließt. Außerdem wurde die Interaktion mit Cdk4 und p16^{Ink4a} untersucht (s. Abb. 26 c) & d), an die Cyclin E nicht binden sollte. Dies wurde auch nicht beobachtet, während Cyclin D1 wie erwartet an p16^{Ink4a} und Cdk4 bindet, ebenso wie die CKIs p21^{Cip1} und p16^{Ink4a} mit Cdk4 interagieren.

Somit bestätigen die Kontrollversuche die bekannten Interaktionen (Ruas und Peters, 1998; Hengst und Reed, 1998; Nakayama, 1998; Sherr und Roberts, 1995). Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Spezifität des 2-Hybrid-Systems sehr hoch ist und die Aktivierung des Reportergens eine verlässliche Meßgröße für die Interaktion der zu untersuchenden Zellzyklusproteine darstellt.

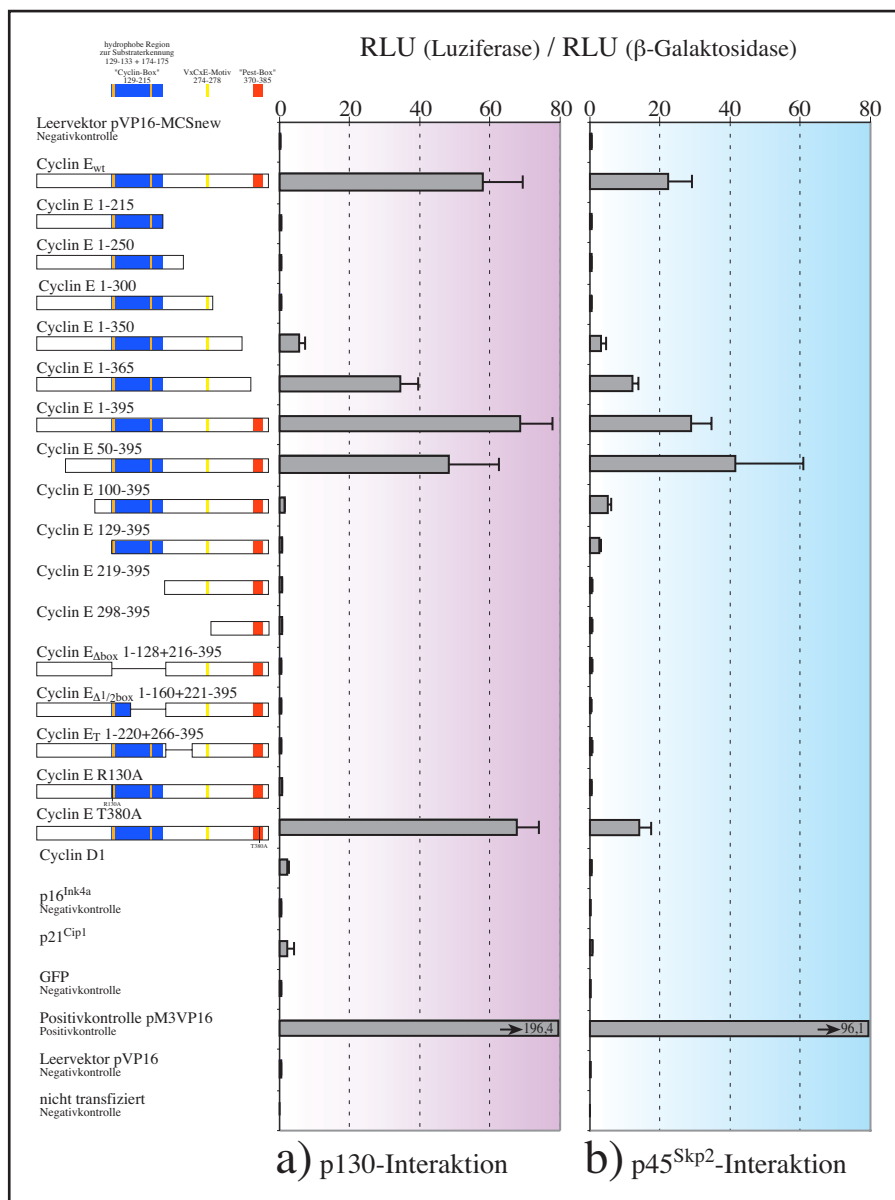


Abb. 27: Analyse der Interaktion von Cyclin E-Mutanten mit p130 bzw. p45^{Skp2} mit dem 2-Hybrid-System.

NIH3T3-Zellen wurden mit den angegebenen Vektoren für VP16-Hybridproteine und a) p130-Gal4-pcDNA3 bzw. b) p45^{Skp2}-pM-MCSnew, sowie 5xGal4-E1b-luc und pZeolacz transfiziert und anschließend die Aktivität von Luziferase und β-Galaktosidase luminometrisch analysiert. Als Einheit der Y-Achse sind relative Lichteinheiten (RLU) der Luziferase geteilt durch die RLU der als internen Standard transfizierten β-Galaktosidase angegeben. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte dreier Messungen mit den jeweiligen Fehlerbalken der Standardabweichung eines Experiments. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei Wiederholungen (2x in NIH3T3- und 1x in HeLa-Zellen), die qualitativ alle gleiche Resultate lieferten.

Die Analyse der Interaktion von Cyclin E und seinen Mutanten mit dem Pocketprotein p130 (s. Abb. 27 a)) ergab, daß diese Interaktion nur mit den Deletionsmutanten, die auch Cdk2 und p21^{Cip1} bzw. p27^{Kip1} binden können, möglich ist. Bemerkenswert ist die starke Aktivierung des Reportergens durch die Interaktion von Cyclin E mit seinem Substratprotein p130.

Außerdem ergab die Untersuchung der Interaktion mit dem F-box-Protein p45^{Skp2}, das den Abbau von phosphoryliertem Cyclin E steuert, daß auch diese Interaktion von den gleichen Mutanten wie alle anderen Interaktionen zuvor bewerkstelligt wird. Hier ist erstaunlich, daß sowohl die nicht mehr phosphorylierbare Punktmutante Cyclin E T380A, die eigentlich nicht mehr an p45^{Skp2} binden sollte (Yeh, *et al.*, 2001), ebenso wie die Mutanten Cyclin E 1-350 bzw. - 1-365, denen der C-Terminus mit der Phosphorylierungsstelle fehlt, noch mit p45^{Skp2} interagieren können.

Weitere Analysen der Interaktion von Cyclin E mit dem CKI p57^{Kip2} bzw. mit dem E3-Protein Cullin 1 ergaben keine Aktivierung des Reportergens (Daten nicht gezeigt), was möglicherweise in der mangelnden Expression des Gal4dbd-p57^{Kip2}- bzw. Gal4dbd-Cullin 1-Fusionsproteins begründet liegt. Daneben konnte auch die Interaktion mit dem Cyclin E-Substrat E2F-1 auf Grund der recht hohen Aktivierung des Reportergens durch den Transkriptionsfaktor E2F-1 selbst nicht durchgeführt werden. Bei ersten Vorversuchen ergab sich eine reprimierende Wirkung der Koexpression von Cyclin E auf die endogene Aktivierung des Reportergens durch Gal4dbd-E2F-1 (Daten nicht gezeigt).

2.3.4 Analyse des Abbaus von Cyclin E-Mutanten durch Ubiquitinierung

Da die Interaktionsanalyse unerwartete Ergebnisse für die Bindung von Cyclin E-Mutanten an den, für den Abbau von phosphoryliertem Cyclin E über das Proteasom, verantwortlichen Faktor p45^{Skp2} ergaben (s. Abb. 8), sollte die Ubiquitinierung der Cyclin E-Mutanten näher untersucht werden. Dazu wurden Cyclin E-Mutanten in NIH3T3-Zellen transient exprimiert und die Zellen mit dem Proteasominhibitor LLNL behandelt. Bei Hemmung des Proteasoms, treten ubiquitinierte Formen der Proteine auf, die nicht mehr abgebaut werden können. Die Akkumulation solcher modifizierter Proteine ist im Immun Blot zu detektieren. In Abb. 28 sind kurze und längere Exponate eines Blots mit transient exprimierten Cyclin E-Mutanten dargestellt, dabei ist zu sehen, daß für das Cyclin E_{wt}-Protein bei längerer Exposition eine Art Leiter auftritt, die durch Ubiquitinierung und mangelnden Abbau hervorgerufen wird. Dies ist auch für die Deletionsmutanten Cyclin E 1-300, - 1-365, - Δ 1/2box und die Punktmutanten Cyclin E R130A und - T380A zu beobachten, wobei letztere deutlich weniger modifiziert wird. Die Induktion ubiquitinierten Cyclin E-Formen durch den Proteasomhemmer LLNL ist bei Cyclin E 50-395, -100-395, - 129-395 und - 219-395 zwar deutlich schwächer, aber immer noch detektierbar. Dabei hat die Deletion der N-terminalen Region Auswirkung auf die Effizienz der Ubiquitinierung, ebenso wie die Mutation der AS 380, denn die Punktmutante Cyclin E T380A zeigt im Verhältnis zum Wildtyp-Protein deutlich weniger akkumuliertes Protein mit Ubiquitinketten. Diese geringe Ubiquitinierung der Punktmutante Cyclin E T380A bestätigt ebenso wie die Auswirkungen auf das Cyclin E_{wt}-Protein bekannte Daten (Clurman, *et al.*, 1996; Singer, *et al.*, 1999; Yeh, *et al.*, 2001). Es werden also nicht nur die mit p45^{Skp2} interagierenden Proteine durch Ubiquitinierung modifiziert und abgebaut, sondern auch weitere Mutanten von Cyclin E. Dies könnte durch das Protein Cullin 3 vermittelt werden, das freies Cyclin E für den Proteasomabbau bindet und

modifiziert. Dessen Interaktion mit den Cyclin E-Mutanten konnte in 2.3.3 nicht untersucht werden.

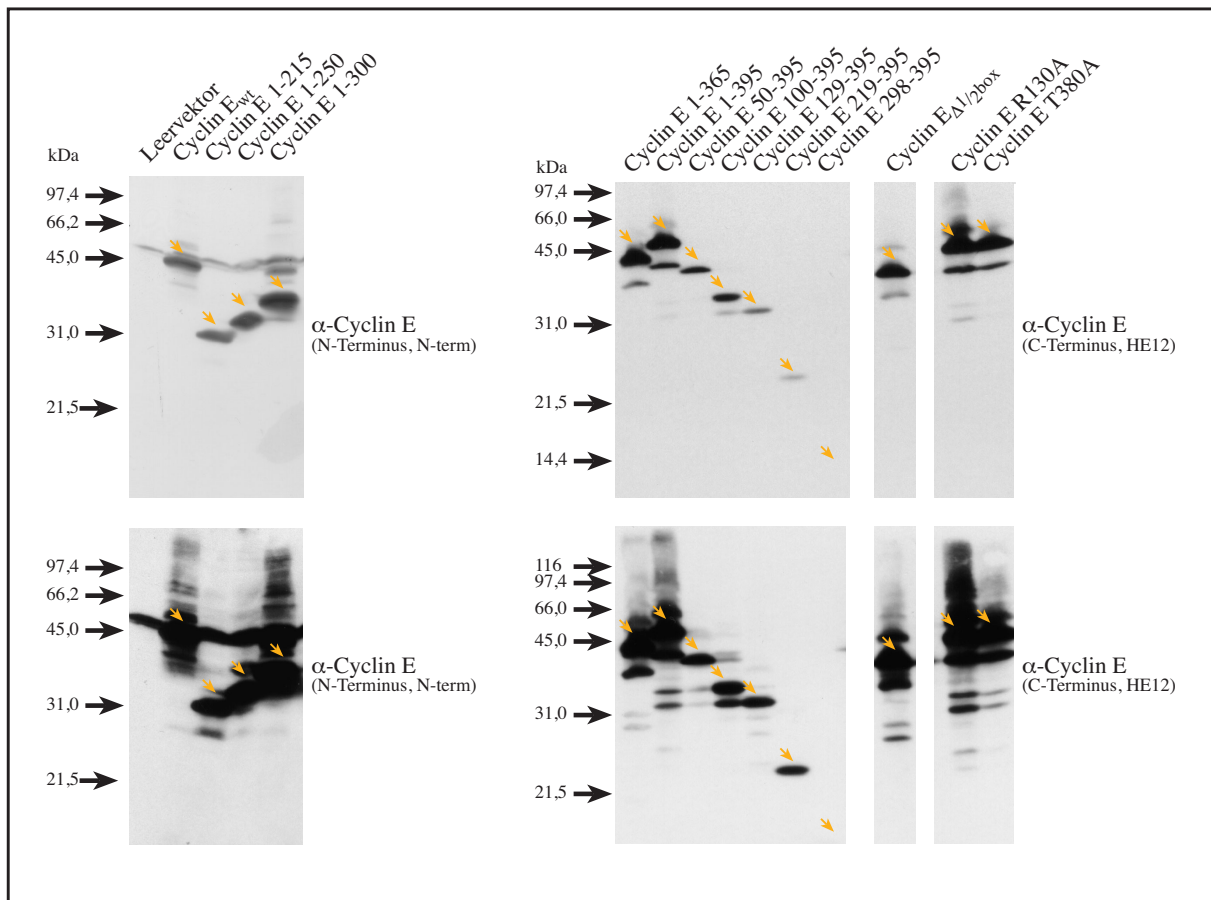


Abb. 28: Cyclin E-Mutanten werden ubiquitiniert.

NIH3T3-Zellen wurden nach der $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Methode transfiziert und für 8 h mit 50 μM LLNL behandelt. Ganzellextrakte wurden via Immun Blot mit den angegebenen α -Cyclin E-Antikörpern analysiert. Gezeigt sind jeweils oben ein kurzes und unten ein langes Exponat derselben Membran.

Zusammenfassend kann die Fähigkeit von Cyclin E mit Partnerproteinen zu interagieren in fast allen Fällen auf die zentrale Region des Proteins von AS 129-350 eingegrenzt werden (s. Abb. 29). Dabei ist die Bindung von Cdk2 nicht gleichbedeutend mit der Aktivierung der Kinase. Da für die Bindung aller Partnerproteine die gleiche Region verantwortlich ist und die Punktmutation der AS 130 diese alle verhindert, scheint eine Bindung von Cyclin E an Cdk2 essentiell für alle anderen Interaktionen zu sein. Sonst müßte Cyclin E immer mit dem gleichen Teil seiner Moleküloberfläche an die verschiedenen Partnerproteine binden, was sehr unwahrscheinlich ist und auch durch die Daten der Kristallstruktur von Cyclin A/Cdk2 nicht unterstützt wird (Jeffrey, *et al.*, 1995; Russo, *et al.*, 1996b). Möglicherweise bewirkt aber auch diese eine Punktmutation eine Konformationsänderung des Proteins, so daß keine Interaktion mehr möglich sind. Da bei transienten Transfektionen meist nur geringe Mengen dieser Punktmutante gefunden wurden und die Ubiquitinierung stärker als die des Cyclin E_{wt}-Proteins ist, kann es sich auch um einen Effekt handeln, der auf beschleunigtem Abbau beruht. Durch die Daten der Interaktionsanalyse wird eine kooperative Bindung des Komplexes aus Cyclin E und Cdk2 an die CKIs und Substratproteine eher favorisiert, konnte aber im 2-Hybrid-System nicht direkt nachgewiesen werden.













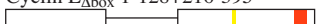
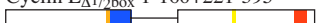



<div> <div> <div>hydrophobe Region zur Substraterkennung 129-133 + 174-175</div> <div>Cyclin-Box 129-215</div> </div> <div> <div>VxCxE-Motiv 274-278</div> <div>"Post-Box" 370-385</div> </div> </div>	Cdk2- Bindung	Cdk2- Aktivierung	p21 ^{Cip1} - Bindung	p27 ^{Kip1} - Bindung	p130- Bindung	p45 ^{Skp2} - Bindung	Ubiquitinierung
Cyclin E _{wt} 1-395 	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++
Cyclin E 1-215 	-	-	-	-	-	-	-
Cyclin E 1-250 	-	-	-	-	-	-	-
Cyclin E 1-300 	-	-	-	-	-	-	+++
Cyclin E 1-350 	++	-	+	+	+	+	?
Cyclin E 1-365 	++	+	++	++	++	++	+++
Cyclin E 1-395 	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++
Cyclin E 50-395 	++	+	+++	++++	+++	++++	+
Cyclin E 100-395 	+	-	+	+	+	+	+
Cyclin E 129-395 	+	-	+	+	-	+	+
Cyclin E 219-395 	-	-	-	-	-	-	+
Cyclin E 298-395 	-	-	-	-	-	-	-
Cyclin E _{Δbox} 1-128+216-395 	-	-	-	-	-	-	?
Cyclin E _{Δ1/2box} 1-160+221-395 	-	-	-	-	-	-	+++
Cyclin E _T 1-220+266-395 	-	-	-	-	-	-	?
Cyclin E R130A 	-	?	-	-	-	-	?
Cyclin E T380A 	+++	?	++	+++	+++	++	++

Abb. 29: Zusammenfassung der in 2.3 beobachteten Eigenschaften von Cyclin E und seinen Mutanten.

2.4 Etablierung und Analyse stabiler, Cyclin E-Mutanten überexprimierender REF-Zelllinien

Um die Eigenschaften der Cyclin E-Mutanten *in vivo* untersuchen zu können, wurden aus den in 2.2.1 beschriebenen Foci stabile Zelllinien etabliert. Die *in vivo* Charakteristika der zur transformierenden Cyclin E-Mutanten sollten im weiteren an den einzelnen stabilen Zelllinien mit verschiedenen Methoden untersucht werden.

2.4.1 Analyse der RNA-Expression etablierter REF-Zelllinien

Zunächst wurde die Expression der Cyclin E-Mutanten durch eine Northern Blot Analyse bestätigt (s. Abb. 30). Als Kontrollen wurden Proben von primären REF und von REF-Zelllinien, die durch SV40largeT, Myc, Cyclin D1 bzw. Cyclin D3 in Kombination mit Ha-Ras-V12 transformiert worden waren, eingesetzt. Hybridisierung mit Sonden für *Myc* und *Cyclin D3* ergaben spezifische Signale nur in den durch die Expression dieser cDNAs transformierten Zelllinien (Daten nicht gezeigt). Es können unterschiedlich lange Transkripte der verschiedenen

Cyclin E-Mutanten detektiert werden. Vor allem die N-terminal deletierten Mutanten bedingen eine kürzere mRNA, während die mRNAs der GFP-fusionierten Mutanten wie erwartet größer als die des Wildtyps sind.

Eine Untersuchung der beschriebenen Zielgene von Cyclin E ergab keine auswertbaren Informationen. Die Expression von Cyclin E ist mit der nachfolgenden transkriptionellen Aktivierung der Gene für *Cyclin A*, *Dihydrofolatreduktase* (DHFR), *b-Myb* oder auch *Thymidinkinase* (TK) durch freie E2F-Komplexe verbunden (DeGregori, *et al.*, 1995; Sala, *et al.*, 1997; Saville und Watson, 1998). Die Untersuchung der mRNA-Expression dieser Cyclin E-Zielgene durch Hybridisierung von RNA-Blots mit den entsprechenden Sonden ergab keine sichtbare, spezifische Aktivierung dieser Gene in den stabilen REF-Zelllinien. Nur für *Cyclin A* konnte eine Aktivierung in der Probe der durch SV40largeT-Antigen transformierten Zelllinie beobachtet werden (s. Abb. 30).

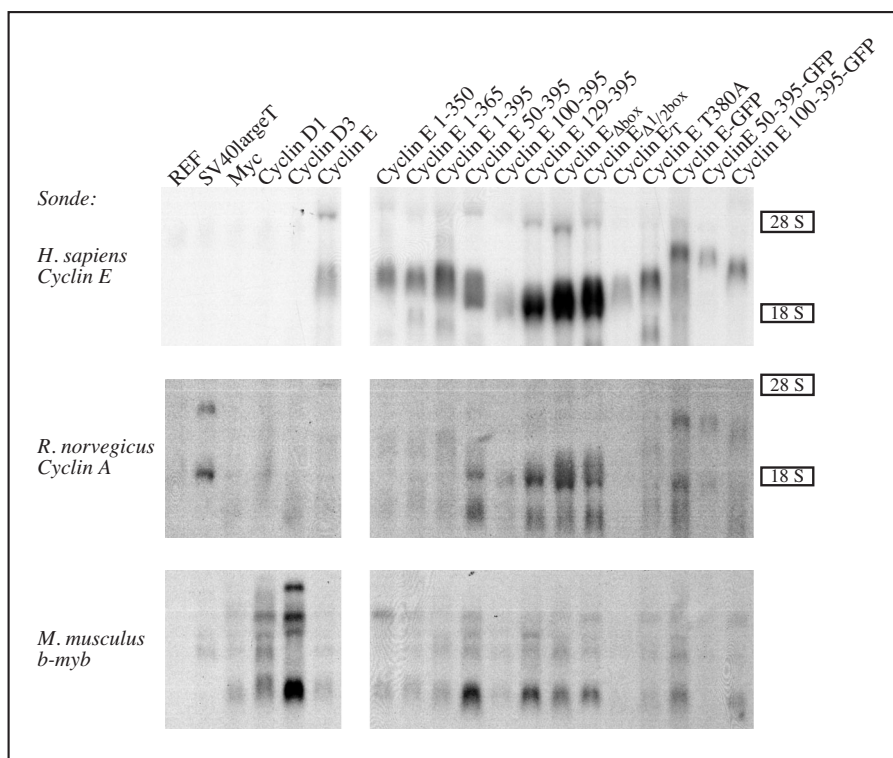


Abb. 30: Northern Blot Analyse etablierter REF-Zelllinien.

8 μ g Total-RNA der angegebenen REF-Zelllinien wurde durch denaturierende Agarose-gelelektrophorese auf-getrennt, auf eine Nylonmembran trans-feriert und anschließend mit den seitlich vermerkten, radioaktiv markierten cDNA-Sonden hybridisiert.

Da das largeT-Antigen die Pocketproteine inhibiert und dadurch E2F freisetzt ist in dieser Zelllinie eine Aktivierung der E2F-Zielgene zu erwarten. Da nur im Falle von Cyclin A eine Ratten-cDNA als spezifische Sonde zur Verfügung stand, während sonst nur murine cDNAs eingesetzt werden konnten, ist eine unbefriedigende Detektion möglicherweise auf die ungenügende Homologie der benutzten Sonden zurückzuführen.

2.4.2 Protein-Expressionskontrolle in etablierten REF-Zelllinien

Die Identität der etablierten, stabilen REF-Zelllinien sollte auch an Hand der Expression der die Transformation hervorrufenden cDNAs kontrolliert werden. Dazu wurden Ganzzellextrakte mittels Immun Blots untersucht und die Expression der verschiedenen Cyclin E-Mutanten mit den erwarteten relativen Molekulargewichten in den jeweiligen Zelllinien nachgewiesen (s. Abb. 31).

Nur die Größe des Cyclin E_{Δbox}-Proteins entspricht nicht dem errechneten rel. Molekulargewicht von 35 kDa. Dabei kann es sich um ein verändertes Laufverhalten auf Grund von Modifikationen, z.B. Ubiquitinierung, handeln. Da in fast allen Proben der durch Cyclin E-Mutanten transformierten Zelllinien auch Banden mit größerem rel. Molekulargewicht als errechnet auftreten, kann es sich dabei um eine generelle Modifikation (Phosphorylierung, Ubiquitinierung) handeln. Da in transienten Transfektionen ähnliche „Leiter“-Muster nach Hemmung des Proteasoms auftreten (s. Abb. 28), kann es sich in den REF-Zelllinien auch um ubiquitinierte Formen der Cyclin E-Proteine handeln. Dies würde bedeuten, daß alle transformierend wirkenden Cyclin E-Mutanten über das Proteasom abgebaut werden. Versuche mit LLNL behandelten REF-Zellen könnten dies bestätigen, wenn der Anteil an hochmolekularen Cyclin E-Proteinen dadurch verstärkt wird. Da auch kleinere immunreaktive Formen der Cyclin E-Mutanten mit den spezifischen Antikörpern gegen den C-Terminus des Cyclin E-Proteins (HE12, C19) zu detektieren sind, ist der Schluß naheliegend, daß es sich um verkürzte Formen der Cyclin E-Mutanten handelt, die von alternativen Translations-initiationskodons initiiert werden. Jedoch sind auch mit dem Antikörper gegen den N-Terminus des Cyclin E-Proteins in einigen Fällen weitere Signale zu beobachten. Dies spricht eher für Abbauprodukte der vollständigen Proteine oder unvollständige Translation der mRNAs.

Alle analysierten REF-Zelllinien zeigen Expression des für die Transformation notwendigen Ha-Ras, während primäre REF dieses Protein nicht exprimieren. Als Kontrolle wurde mit einem α -Myc-Antikörper hybridisiert, wobei nur für die durch Myc transformierte Zelllinie auch Expression von Myc nachgewiesen werden konnte.

Für p21^{Cip1} konnten mit den verwendeten Antikörpern im Immun Blot keine Signale in den analysierten REF-Zelllinien oder primären REF-Zellen festgestellt werden, so daß von fehlender Expression dieses Proteins in diesen Zellen auszugehen ist. Hingegen konnte in den meisten Extrakten das p27^{Kip1}-Protein nachgewiesen werden. Einige Zelllinien wiesen verringerte Mengen von p27^{Kip1} auf, die auf verstärkten Abbau zurückzuführen sein können. Ein spezifischer Effekt von Cyclin E auf die Stabilität von p27^{Kip1} konnte nicht beobachtet werden.

Die Expression von p53^{Kip2}, Cdk2 ebenso wie die der Pocketproteine und Cyclin E-Substrate pRb, p107 und p130 waren in fast allen Linien nicht nennenswert verändert, wenn auch einige Proben nur sehr schwache Signale hervorriefen (s. Abb. 31). Eine spezifische Auswirkung der Expression von Cyclin E oder seiner Mutanten auf den Phosphorylierungsstatus der Pocketproteine konnte anhand der Immun Blots nicht nachgewiesen werden

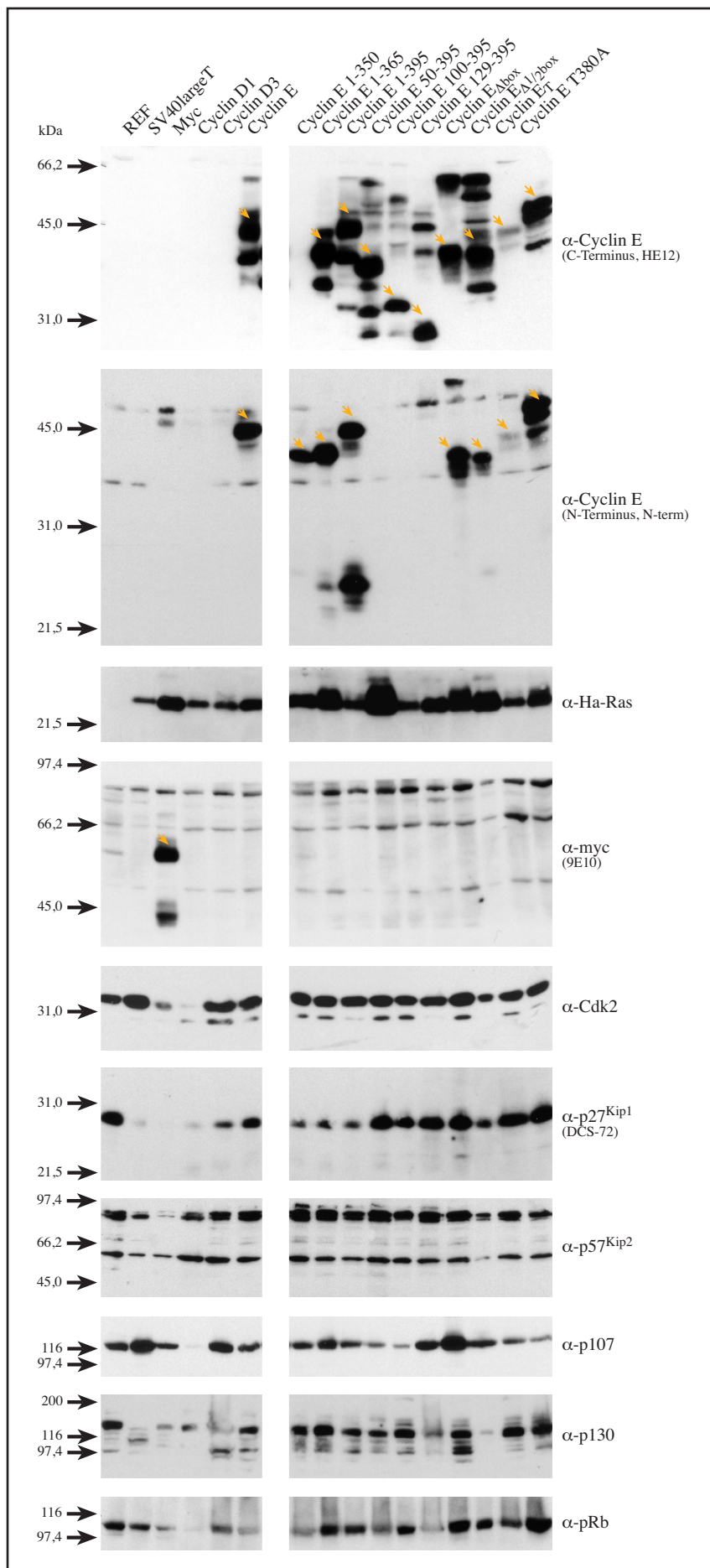


Abb. 31: Immun Blot Analyse etablierter REF-Zelllinien.

50 μ g Protein aus Gesamtzellextrakten der angegebenen REF-Zelllinien wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit den angegebenen Antikörpern hybridisiert.

2.4.3 Analyse der *in vivo* an Cyclin E-Mutanten gebundenen Proteine und deren Kinaseaktivität

Um die Fähigkeiten der Cyclin E-Mutanten *in vivo* zu untersuchen, wurden Zellextrakte der etablierten Zelllinien Immunpräzipitationen unterzogen, um die Proteinkomplexe, in denen Cyclin E vorkommt zu analysieren. Eine Präzipitation von Cdk2 ergab, daß nur die Cyclin E-Mutanten, die bereits im 2-Hybrid-System (Cyclin E_{wt}, - 1-350, - 1-365, - 1-395, - 50-395, - 100-395, - 129-395 und -T380A, s. 2.3.3) mit Cdk2 interagieren konnten, auch *in vivo* an Cdk2 gebunden sind (s. Abb. 32). Die Cyclin E-Mutanten - Δ box und Δ 1/2box, sowie Cyclin E_T waren dazu nicht in der Lage. Bemerkenswert ist die Beobachtung, daß auch kleinere Formen der Cyclin E-Mutanten, die evtl. durch alternative Translation entstehen, noch an Cdk2- gebunden vorgefunden werden. Da diese Formen wahrscheinlich teilweise mit den N-terminal trunkeierten Mutanten übereinstimmen, kann ihre Bindung als Bestätigung der Bindung der homologen Mutanten betrachtet werden.

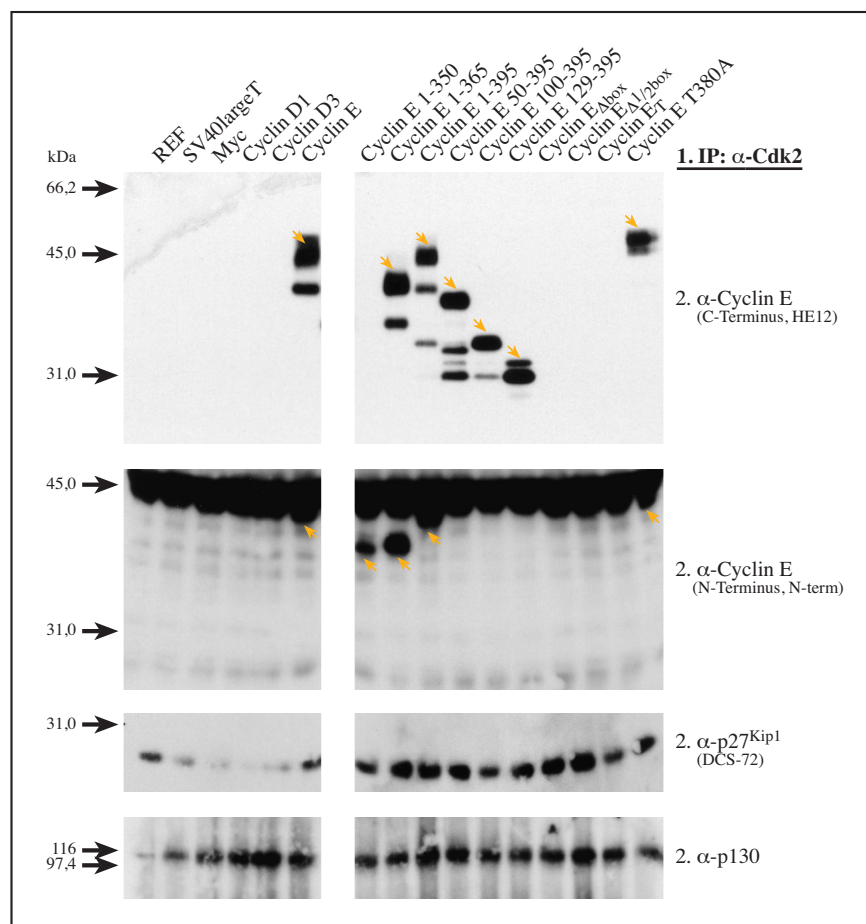


Abb. 32: Analyse der *in vivo* Cdk2-Bindung von Cyclin E-Mutanten.

200 μ g Protein aus Ganzzelextrakten der angegebenen REF-Zelllinien wurden mit α -Cdk2 immunpräzipitiert und ein Aliquot durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit den angegebenen Antikörpern hybridisiert.

Außerdem wurden die präzipitierten Cdk2-Proteinkomplexe auf das Vorhandensein weiterer Proteine untersucht: Von den Pocketproteinen konnte p130 in gleichmäßigen Mengen, assoziiert mit Cdk2 gefunden werden, während pRb und p107 nicht zu detektieren waren (s. Abb. 32 & Daten nicht gezeigt). Die CKIs p21^{Cip1} und p57^{Kip1} wurden nicht an Cdk2 gebunden vorgefunden bzw. konnten durch Kreuzreaktion des α -Kaninchen-Antikörpers in Immunpräzipitaten mit Kaninchen-Antikörpern nicht detektiert werden. Hingegen wurde p27^{Kip1} deutlich in allen Cdk2-Präzipitaten aus Zellextrakten von Cyclin E transformierten Zelllinien beobachtet, während in den

Kontrolllinien (SV40largeT, Myc, Cyclin D1 und Cyclin D3) kein p27^{Kip1} gebunden an Cdk2 zu finden war. Letzteres kann auf einen schon beobachteten effekt der Umverteilung von p27^{Kip1} bei Expression von Myc oder einem D-Typ-Cyclin zurückzuführen sein (Bouchard, *et al.*, 1999; Perez-Roger, *et al.*, 1999).

Die Aktivität der Cdk2-Proteinkomplexe wurde ebenfalls durch Immunpräzipitation und anschließendem Kinase-Assay analysiert, um das Aktivierungspotential der Cyclin E-Mutanten bzw. die Folgen ihrer Expression auf den Aktivitätsstatus von Cdk2 zu untersuchen. Dabei konnten keine größeren Unterschiede in der Aktivität der Cdk2-Komplexe an sich gefunden werden, wenn auch in den Zelllinien, die durch Cyclin E_{wt}, Cyclin E 1-395 und Cyclin E 50-395 transformiert wurden eine etwas erhöhte Cdk2-gebundene Histon H1-Kinaseaktivität festgestellt werden konnte.

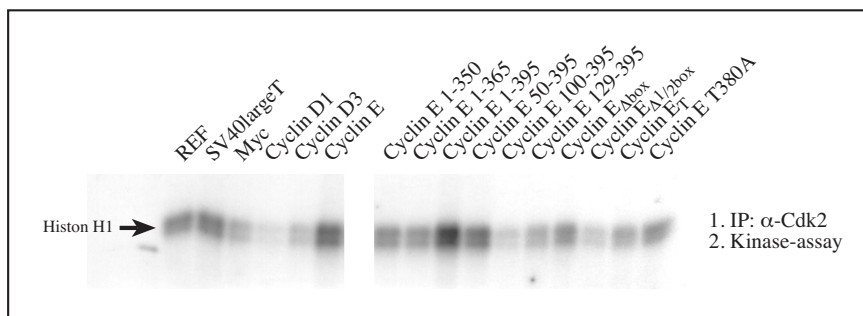


Abb. 33: Analyse der *in vivo* Aktivierung von Cdk2 durch Cyclin E-Mutanten.

200 μ g Protein aus Ganzzellextrakten der angegebenen REF-Zelllinien wurden mit α -Cdk2 immun-präzipitiert, das Präzipitat in einem Kinase-Assay eingesetzt und durch SDS-PAGE aufgetrennt.

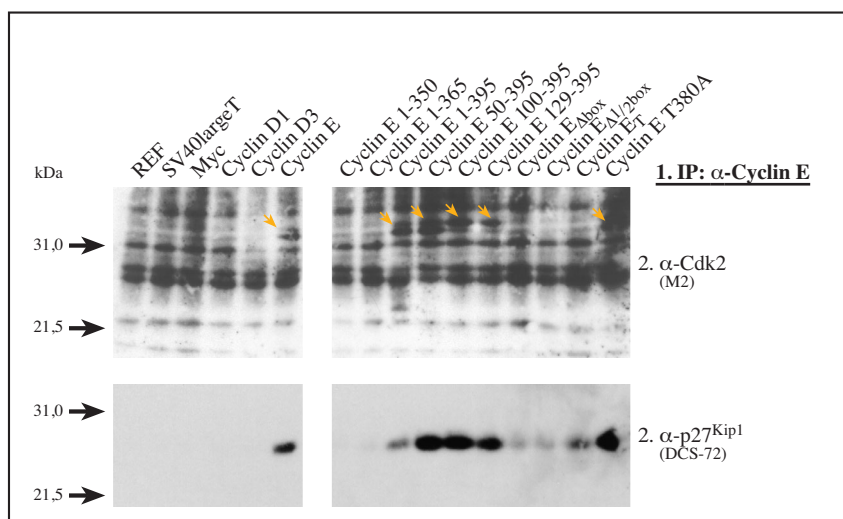


Abb. 34: Analyse der *in vivo* an Cyclin E-Mutanten gebundenen Proteine.

200 μ g Protein aus Ganzzellextrakten der angegebenen REF-Zelllinien wurden mit α -Cyclin E (C-19) immunpräzipitiert und ein Aliquot durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit den angegebenen Antikörpern hybridisiert.

Durch Immunpräzipitation mit α -Cyclin E-Antikörper wurden die an Cyclin E und seine Mutanten *in vivo* gebundenen Proteine analysiert. Auf Grund der Antikörperspezifität konnten nur die Mutanten mit intaktem C-Terminus untersucht werden, so daß in diesen Experimenten die übrigen Proben als Negativkontrollen fungierten. In den Präzipitaten konnte nur Cdk2 und p27^{Kip1} gebunden an einige Cyclin E-Mutanten nachgewiesen werden. Für p21^{Cip1}, p107, p130 und pRb wurden keine Signale detektiert. In diesem Versuch haben nur Cyclin E_{wt}, - 1-395, - 50-395, - 100-395, - 129-395 und -T380A die Fähigkeit Cdk2 und p27^{Kip1} zu binden. Dies bestätigt

nochmals die Ergebnisse der 2-Hybrid-Analyse und der α -Cdk2-Immunpräzipitation (s. Abb. 25 & 32). Zu bemerken ist die Bindung der zuvor als kinaseaktivierend identifizierten Cyclin E-Proteine (Cyclin E_{wt}, - 1-395, - 50-395 und - T380A, s. Abb. 23) an eine im SDS-Gel schneller laufende Form von Cdk2, während Cyclin E 100-395 und - 129-395 hauptsächlich die langsamer migrierende Form binden (s. Abb. 34). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um unterschiedlich phosphorylierte und aktivierte Formen des Cdk2. Die kinaseaktivierende Funktion der Cyclin E-Mutanten ist also mit vermehrter Bindung an phosphoryliertes Cdk2 verbunden.

Die Cyclin E gebundene Histon H1-Kinaseaktivität wurde ebenfalls analysiert, wobei keine Veränderungen innerhalb der untersuchten Zelllinien festgestellt wurden (Daten nicht gezeigt). Da dies im Gegensatz zu anderen Ergebnissen steht (s. Abb. 23 & 36 bzw. Daten nicht gezeigt), ist von nicht repräsentativen Versuchsergebnissen auszugehen, die möglicherweise auf unterschiedliche Qualität verschiedener Antikörper-Aliquots zurückzuführen ist und die *in vivo* Kinaseaktivierung durch Cyclin E-Mutanten in etablierten REF-Zelllinien noch weiter zu untersuchen.

Die in 2.2.1 erwähnten, durch Cyclin E-GFP Fusionsproteine und Ha-Ras-V12 hervorgerufenen Foci wurden ebenfalls als Zelllinien etabliert und auf RNA-Expression der eingesetzten cDNAs untersucht (s. 2.4.1). Die Proteinexpression dieser Zellen ist im weiteren durch Immun Blots analysiert worden und es konnten die erwarteten, der Transformation zu Grunde liegenden Cyclin E-GFP-Proteine mit den korrekten relativen Molekulargewichten nachgewiesen werden (s. Abb. 35).

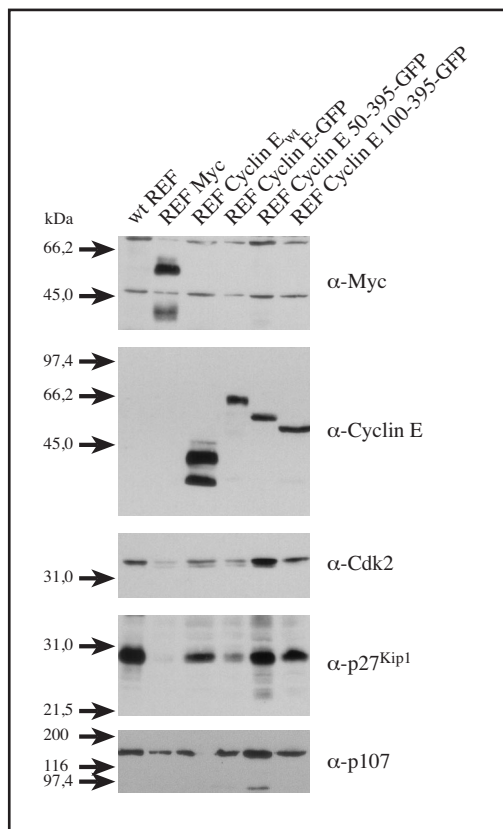


Abb. 35: Immun Blot Analyse etablierter REF-Zelllinien.

50 μ g Protein aus Ganzzelextrakten der angegebenen REF-Zelllinien wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit den angegebenen Antikörpern hybridisiert.

Als Kontrolle wurden primäre REF und je eine durch *Myc* bzw. *Cyclin E*_{wt} transformierte Zelllinie eingesetzt und die spezifische Expression von Myc und Cyclin E_{wt} im Immun Blot überprüft.

Die Analyse der hier untersuchten REF-Zelllinien zeigt eine Erhöhung sowohl der Cdk2-gebundenen, als auch der Cyclin E-gebundenen Histon H1-Kinaseaktivität in den Zelllinien, die durch Cyclin E_{wt}, Cyclin E_{wt}-GFP oder Cyclin E 50-395-GFP transformiert wurden (s. Abb. 36). Dies entspricht dem *in vitro* erhaltenen Ergebnis mit unfusionierten Cyclin E-Proteinen (s. 2.3.2). Weiterhin konnte die Cdk2-Bindung von Cyclin E_{wt}, Cyclin E_{wt}-GFP, Cyclin E 50-395-GFP und Cyclin E 100-395-GFP nachgewiesen werden, wodurch die *in vivo* Interaktion im 2-Hybrid-System bestätigt wird (s. Abb. 25). Zwar konnte für die gleichen Proteine eine p27^{Kip1}-Bindung nachgewiesen werden, doch ist diese nur für die nicht mehr kinaseaktivierende Mutante Cyclin E 100-395-GFP gut detektierbar. Möglicherweise ist die fehlende Detektion in den anderen Cyclin E-Komplexen bzw. Cdk2-Komplexen im Generellen auf die Kinaseaktivität von Cyclin E/Cdk2 gegenüber p27^{Kip1} und den dadurch eingeleiteten Abbau dieses Proteins bedingt.

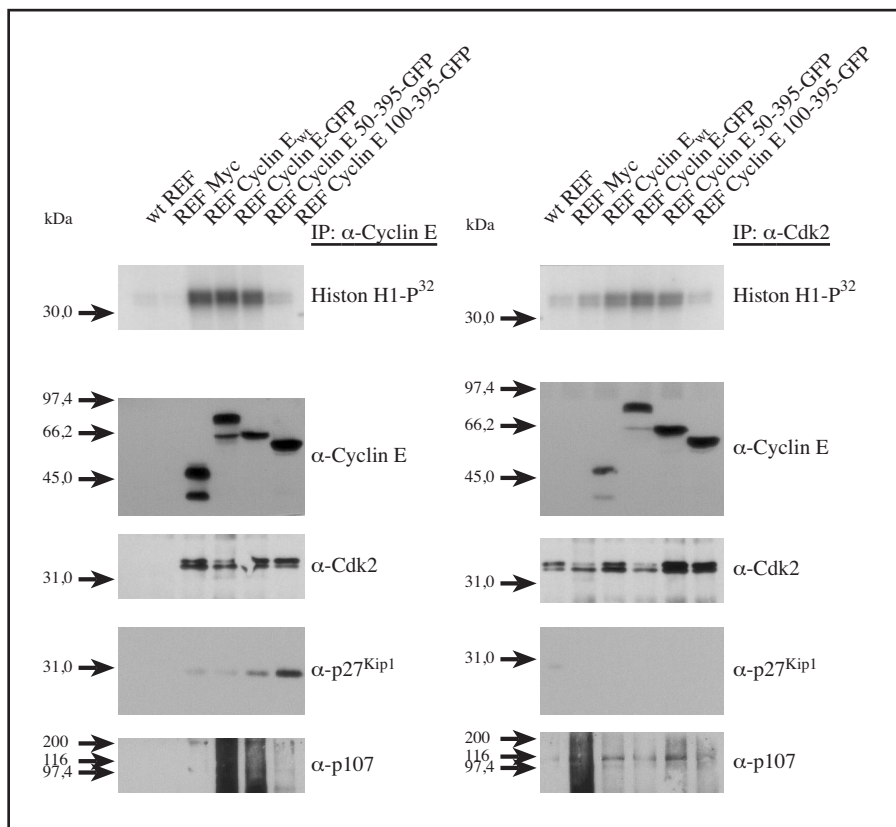


Abb. 36: Analyse der *in vivo* Cdk2-Bindung und -Aktivierung durch Cyclin E-GFP-Fusionsproteine.

200 μ g Protein aus Ganzzelextrakten der angegebenen REF-Zelllinien wurden mit a) α -Cdk2 oder b) α -Cyclin E (C-19) immunpräzipitiert, das Präzipitat entweder in einem Kinase-Assay eingesetzt oder durch Immun Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert.

2.4.4 Untersuchung zur Zellzyklusverteilung von Cyclin E transformierten REF-Zelllinien

Da der Mechanismus der malignen Transformation durch Zellzyklusregulatoren bislang nicht endgültig geklärt war, wurde angenommen, daß bei Überexpression von G₁-Phase-Regulatoren auch der Restriktionspunkt außer Kraft gesetzt würde und damit die Progression in die S-Phase ungehindert verlaufen könnte. Dies würde eine beschleunigte Proliferation und eine erhöhte S-Phasen-Population in den transformierten Zellen erwarten lassen. Der erhöhte Anteil an S-Phase-Zellen konnte für Cyclin E transformierte REF-Zelllinien schon gezeigt werden (Mumberg, *et al.*, 1996). Dieses Phänomen sollte an den durch Cyclin E-Mutanten transformierten Zelllinien näher untersucht werden. Dabei ergab sich kein einheitliches Bild: Zwar konnte bei einigen Zelllinien eine vergrößerte S/G₂-Phasen-Population festgestellt werden, doch zeigten andere Linien eine normale Zellzyklusphasenverteilung, wobei sich die meisten Zellen in der G₁-Phase befanden. Der

Befund von Haas *et al.* (1997), der zeigt, daß in Cyclin E transformierten REF-Zelllinien ein erhöhter Anteil an polyploiden Zellen zu finden ist, konnte in keiner der untersuchten Zelllinien bestätigt werden (s. Abb. 37 & Daten nicht gezeigt). Allerdings wurde in allen analysierten Zelllinien gegenüber den untransformierten REF-Zellen eine Erhöhung der Zellen mit DNA > 4N beobachtet. Außerdem zeigten z.B. die durch SV40largeT-Antigen oder Myc transformierten Zellen einen sehr hohen Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen.

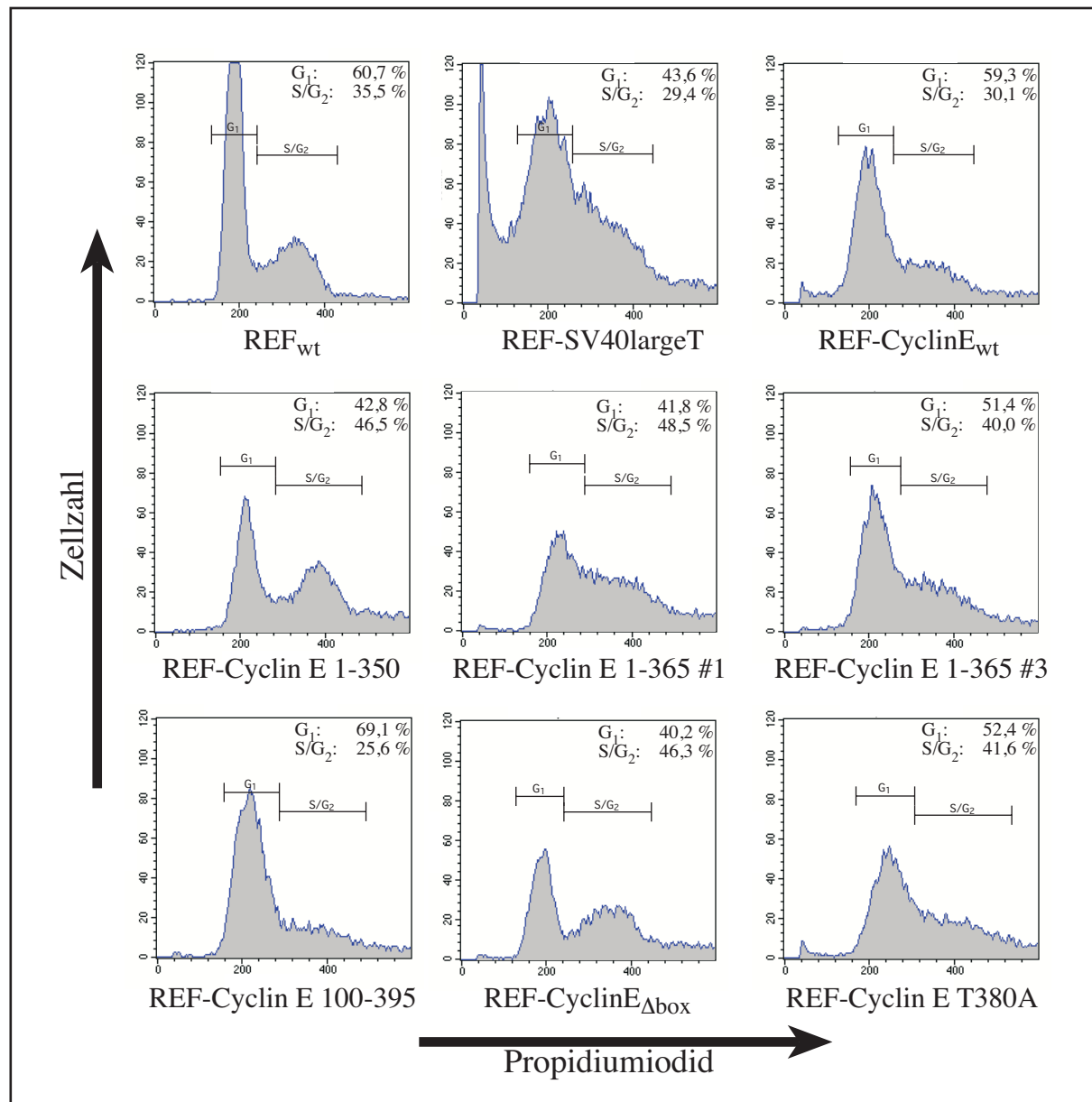


Abb. 37: Durchflußzytometrische Analyse von REF-Zelllinien.

Die „ungehindert proliferierenden Zellen der angegebenen, stabilen REF-Zelllinien wurden durchflußzytometrisch auf ihre Zellzyklusverteilung hin analysiert. Dazu wurden mindestens 1×10^4 Zellen elektronisch ausgewählt und ihr DNA-Gehalt über die Propidiumiodid-Fluoreszenz bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Beispiele und die prozentuale Verteilung auf die Zellzyklusphasen G₁ und S/G₂.

2.4.5 Cyclin E-Expression vermittelt eine Resistenz gegen Nocodazol-induzierten M-Phase-Arrest

Falls in den durch Cyclin E transformierten REF-Zelllinien die G₁-S-Transitionskontrolle gestört ist, sollten diese Zellen auch refraktär gegen G₁-Phase-Arrest auslösende Bedingungen sein. Dies wurde mit Analysen der Proliferationshemmung durch Agentien, die einen Arrest in der G₁-Phase

auslösen, untersucht. Dazu wurden Proliferationsanalysen mit dem MTT-Test durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß die transformierten Zellen der verschiedenen Zelllinien alle wesentlich stärker proliferierten als die untransformierten Fibroblasten. Bei zu großer Zelldichte starben die transformierten Zellen schneller ab, während die primären REF-Zellen arretierten, aber überlebten. Bei der Proliferationsgeschwindigkeit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Zelllinien beobachtet werden (s. Abb. 38).

Versuche zur Inhibition der Proliferation durch Arretierung in der G₁-Phase wurden mit Mimosin (hemmt den G₁-S-Phasen-Übergang), Cisplatin (hemmt die Progression in der G₂-Phase), Staurosporin (hemmt die Kinase Cdk2 und löst in hohen Konzentrationen Apoptose aus (Tam und Schlegel, 1992)) oder Etoposid (hemmt die Progression in der G₁- und G₂-Phase) durchgeführt. Es ergab sich eine weitestgehende Übereinstimmung der verschiedenen REF-Zelllinien in ihrer hemmbarkeit durch die eingesetzten Substanzen (s. Abb. 38 & Daten nicht gezeigt). Die einzige Ausnahme bildet die Inhibition der Proliferation durch Nocodazol oder Colcemid (beide arretieren die Zellen durch Inhibition der Mikrotubulipolymerisation in der Metaphase der Mitose), da einige der durch Cyclin E transformierten Zelllinien sich als resistent gegen diese Agentien erwiesen (s. Abb. 38 & Daten nicht gezeigt). Dabei wurde beobachtet, daß nicht alle durch Cyclin E transformierten REF-Zelllinien sich resistent gegen Nocodazol erwiesen, sondern nur bestimmte. Es zeichnet sich ab, daß nur die Zelllinien resistent sind, die ein Cyclin E-Protein überexprimieren, welches auch Cdk2 aktivieren kann, also Cyclin E_{wt}, Cyclin E 1-365, Cyclin E 1-395, Cyclin E 50-395 oder Cyclin E T380A. Dies konnte in einigen, aber nicht allen Fällen der untersuchten und durch diese Cyclin E-Mutanten transformierten Zelllinien nachgewiesen werden (s. Abb. 38 b) & Daten nicht gezeigt).

Die mangelnde Inhibition durch Cyclin E transformierter Zelllinien wurde durch FACS-Analysen weiter untersucht. Nach 24 h Inkubation mit 10 µM Nocodazol zeigen normale untransformierte REF-Zellen einen Arrest in der G₂-Phase des Zellzyklus (s. Abb. 39). Dies ist auch für durch Myc oder SV40largeT transformierte REF-Zelllinien der Fall, während Cyclin E exprimierende REF-Zellen keinen Arrest zeigen. Dies läßt zusammen mit den Daten der mangelnden Proliferationsinhibition durch Nocodazol oder Colcemid, den Schluß auf eine Funktion von überexprimiertem Cyclin E in der Deregulation des M-Phase-Kontrollpunktes zu.

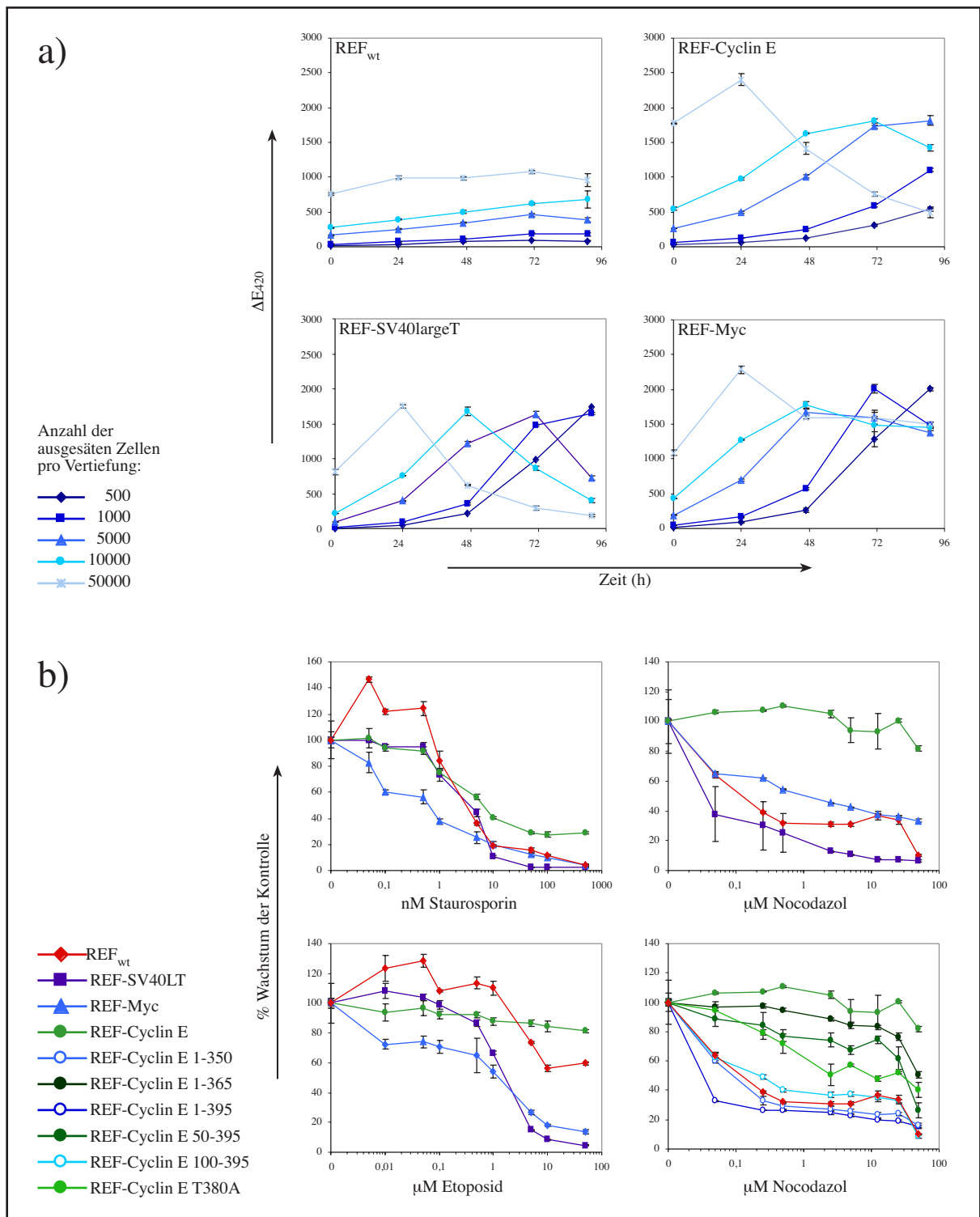


Abb. 38: Analyse des Wachstumsverhaltens ausgewählter REF-Zelllinien.

a) Die angegebenen Zelllinien wurden einer Analyse des Wachstumsverhaltens ausgehend von verschiedenen Zelldichten über einen Zeitraum von 4 Tagen hinweg unterzogen. Die X-Achse gibt die Zeit in Stunden und die y-Achse die relative Erhöhung der ΔE_{420} durch Farbstoffproduktion an. **b)** Darstellung der Proliferationsinhibition der angegebenen REF-Zelllinien durch verschiedene chemische Substanzen. Auf der x-Achse sind die Konzentrationen der eingesetzten Agentien aufgetragen, dabei entspricht die höchste Konzentration einem Vehikeleinsatz von 0,5 % DMSO. Die y-Werte stellen den prozentualen Wert der als 100 % gesetzten Kontrolle ohne Zusatz von Chemikalie oder Lösungsmittel an. Die Kontrolle mit Lösungsmittel alleine (hier 0,5 % DMSO) bewirkte eine Reduktion der Proliferation auf 80-90 % der 100 % Kontrolle.

Gezeigt sind repräsentative Beispiele, die Punkte der Kurven geben Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit den Standardabweichungen als Fehlerbalken wieder.

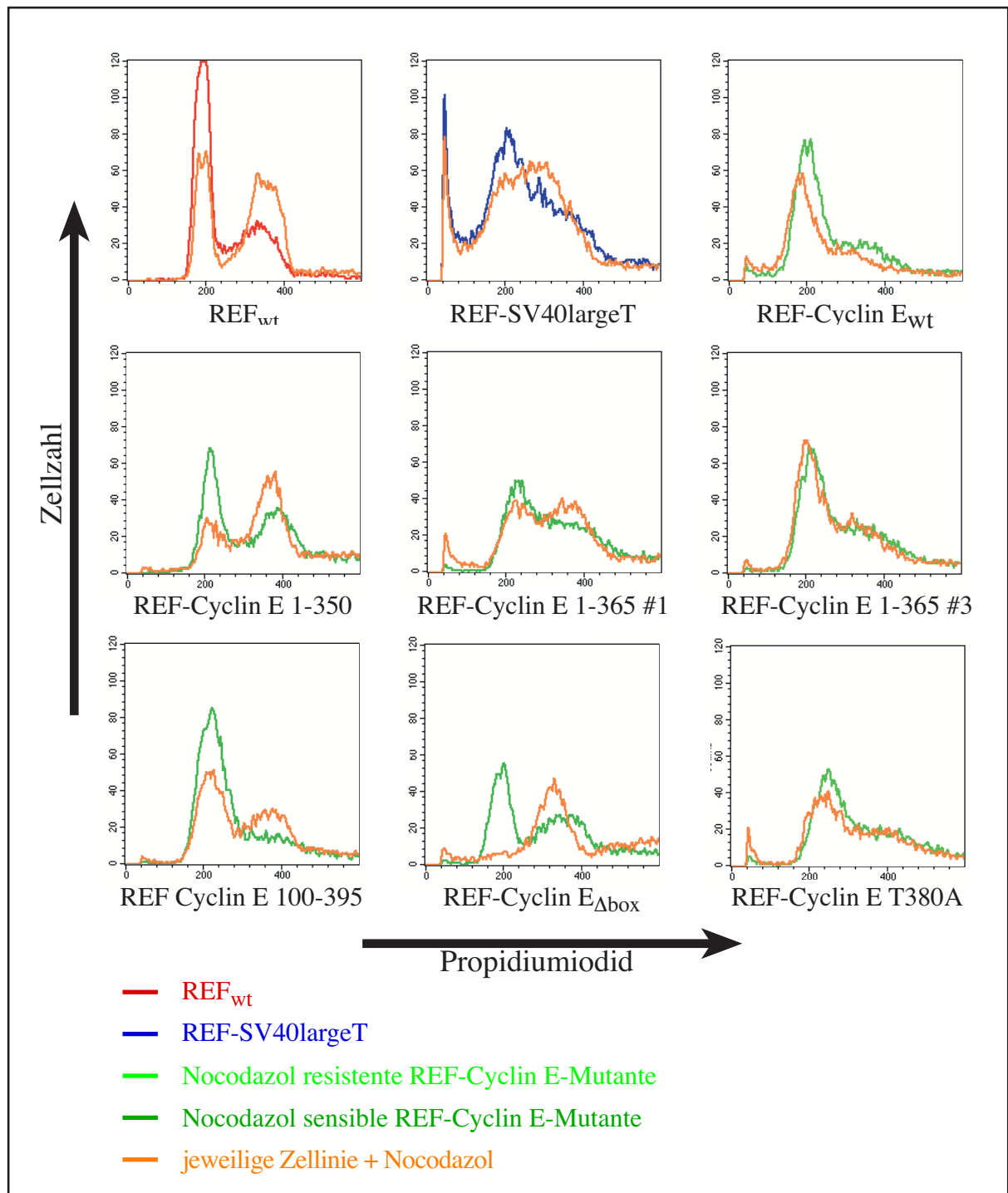


Abb. 39: FACS-Analyse von Nocodazol behandelten REF-Zelllinien.

Zellen der angegebenen stabilen REF-Zelllinien wurden für 24 h mit 10 μ M Nocodazol behandelt, anschließend auf ihre Zellzyklusverteilung hin analysiert und mit unbehandelten Zellen verglichen. Dazu wurden mindestens 1×10^4 Zellen elektronisch ausgewählt und ihr DNA-Gehalt über Propidiumiodid-Fluoreszenz bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Beispiele und die prozentuale Verteilung auf die Zellzyklusphasen G₁ und S/G₂.

2.5 Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Cyclin E-Mutanten

Die Computeranalyse der Aminosäuresequenz von humanem Cyclin E ergab eine putative Kernlokalisierungssequenz (NLS, engl.: nuclear localisation signal) im N-terminalen Bereich des Proteins. Da die Substrate von Cyclin E/Cdk2 nukleäre Proteine sind, ist eine korrekte Lokalisation für eine normale Funktionsfähigkeit des Kinasekomplexes notwendig. Es stellte sich die Frage, ob die Mutanten, die dieses mögliche Lokalisationsmotiv nicht mehr beinhalten korrekt in den Zellkern transportiert werden und ob die subzelluläre Verteilung der Cyclin E-Mutanten einen Einfluß auf ihre transformierenden Eigenschaften haben kann.

2.5.1 Analyse der subzellulären Lokalisation von Cyclin E-Mutanten in NIH3T3-Zellen

Um die intrazelluläre Lokalisation der Cyclin E-Mutanten aufzuklären wurden die cDNAs mit geeigneten Oligonukleotid-Primern amplifiziert und so modifiziert, daß das Stop-Kodon entfernt wurde. Die so durch PCR mutierten cDNAs wurden dann in den Vektor pEGFP-N3 kloniert, der dadurch für ein Fusionsprotein aus dem zu untersuchenden Cyclin E bzw. einer Mutante und dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) kodierte. Diese Konstrukte wurden dann transient in NIH3T3-Zellen transfiziert und die Expression nach Fixierung und Kernfärbung mikroskopisch analysiert. Von den untersuchten Cyclin E(-Mutanten)-GFP-Fusionsproteinen konnte nur das Wildtyp-Protein (= Cyclin E-1-395), sowie die Deletionsmutante Cyclin E 1-365 und die Punktmutante Cyclin E T380A im Zellkern transfizierter Zellen lokalisiert beobachtet werden (s. Abb. 40). Alle anderen Fusionsproteine waren zytoplasmatisch lokalisiert. Dies läßt darauf schließen, daß die ermittelte putative NLS keine Funktion besitzt.

Da geringfügige Mutationen bzw. Deletionen schon eine Änderung der subzellulären Proteinlokalisierung hervorrufen, ist eine Steuerung der Proteinlokalisierung durch Multiproteinkomplexe naheliegend. Weiterhin ist ein anderer Lokalisationsmechanismus als der der klassischen basischen NLS zu vermuten. Da auch die Punktmutante Cyclin E R130A, fusioniert an GFP, nicht mehr im Kern vorgefunden wird und diese Mutante kein Cdk2 mehr binden kann (s. 2.3.3 & Abb. 25 & Clurman, *et al.*, 1996), liegt eine Verbindung der Lokalisation mit der Cdk2-Bindung nahe. Die Lokalisation der als Kontrollen eingesetzten Fusionen aus p21^{Cip1} und p27^{Kip1} mit GFP bzw. Red1 zeigten immer nukleäre Lokalisation (s. Abb. 41 & 42 & Daten nicht gezeigt), während die Fusionsproteine aus Cyclin D1, Cyclin A, Cdk2 und Cdk4 mit GFP immer zytoplasmatisch gefunden wurden (Daten nicht gezeigt). Für p16^{Ink4a} fusioniert an GFP ergab sich kein einheitliches Bild, denn es konnte sowohl ausschließlich zytoplasmatisch, als auch exklusiv nukleär beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Die PCR-modifizierten cDNAs für Partnerproteine von Cyclin E wurden auch in den neu erstellten Vektor pEBFP-N3, der für Fusionsproteine mit blau fluoreszierendem Protein (BFP) kodiert, kloniert. Die nach transienter Transfektion zu beobachtenden blau fluoreszierenden Fusionsproteine wiesen die gleichen Eigenschaften und subzellulären Verteilungen auf, wie die homologen an GFP fusionierten Proteine. Allerdings war die Intensität der BFP-Fluoreszenz sehr schwach und von kurzer Halbwertszeit, so daß Analysen mit dem Laser-Scan-Mikroskop schwierig waren.

Daher wurden für weitere Analysen neue Fusionen mit dem rot fluoreszierenden DsRed1-Protein im neu erstellten Vektor pDsRed1-N3 kloniert. Die Fluoreszenz des DsRed1-Proteins erwies sich als sehr stark und besaß eine sehr lange Halbwertszeit. Das DsRed1-Protein alleine wurde zur Kontrastierung transient transfizierter Zellen verwendet, denn es färbt die Zellen homogen an (s. Abb. 40).

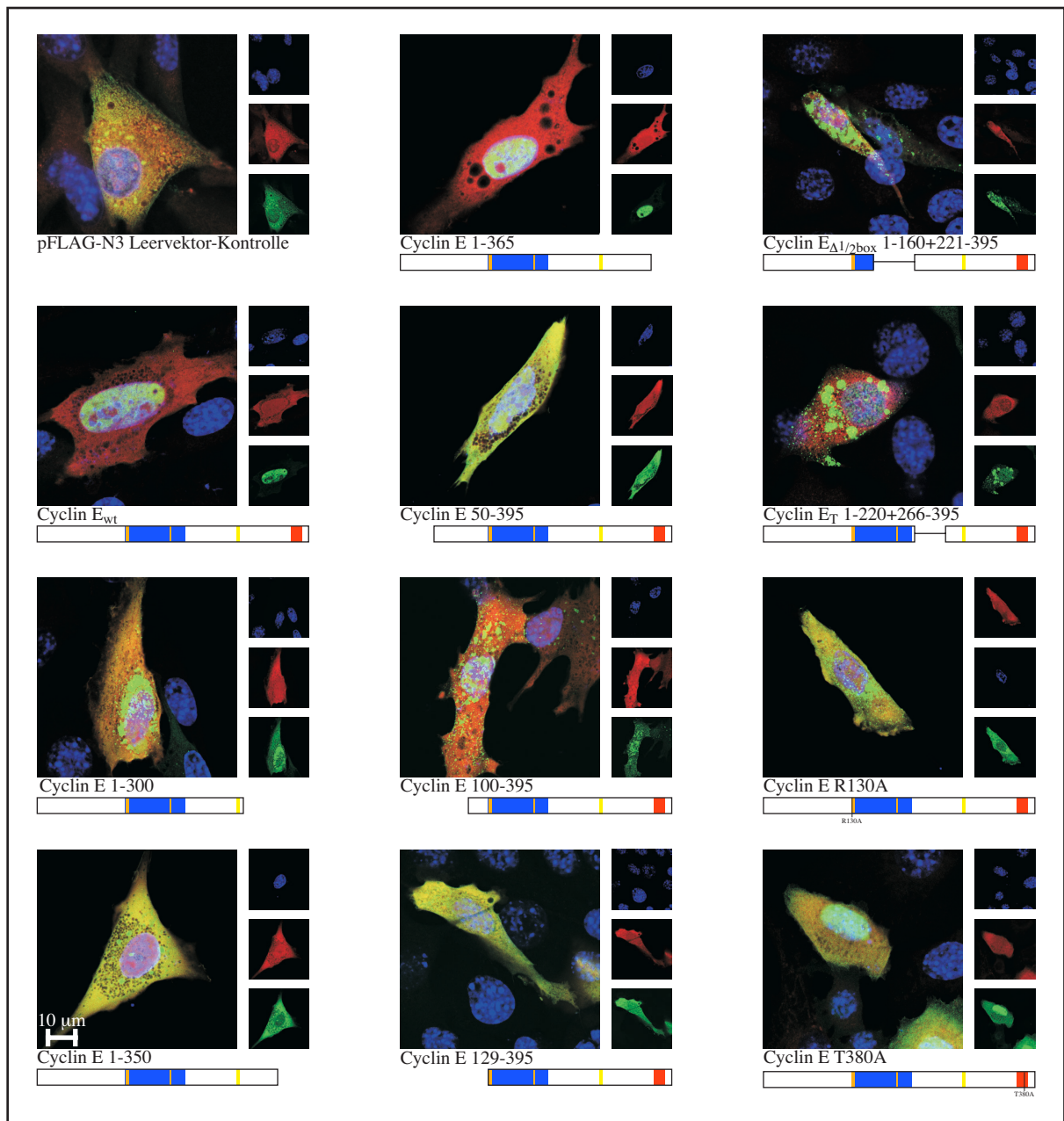


Abb. 40: Analyse der subzellulären Verteilung von Cyclin E-Mutanten.

Fluoreszenzaufnahmen mit dem Laser-Scan-Mikroskop: Es sind repräsentative Beispiele von transient mit den angegebenen Cyclin E-Mutanten-pEGFP-N3-Plasmiden transfizierten NIH3T3-Zellen gezeigt, der Balken links unten repräsentiert 10 μm . Zur Kontrastierung wurde das Plasmid pDsRed1-N3 kotransfiziert, durch dessen Expression das rotfluoreszierende Red1-Protein die ganze Zelle homogen anfärbt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst-Farbstoff angefärbt. Dargestellt ist das GFP-Signal in grün, die Hoechst-Kernfärbung in blau und das Red1-Signal in rot.

Um die Beeinflussung der subzellulären Verteilung der GFP-fusionierten Cyclin E-Mutanten durch Partnerproteine wie z.B. CKIs zu untersuchen wurden Kotransfektionen mit p16^{Ink4a},

p21^{Cip1} oder p27^{Kip1} fusioniert an das rotfluoreszierende Red1- oder das blaufluoreszierende BFP-Protein durchgeführt. Dadurch konnte die Lokalisation der GFP fusionierten Cyclin E-Mutanten beeinflusst werden. Während Koexpression von p16^{Ink4a}-Fusionen keinen Effekt hatte, wurden die meisten Cyclin E-Mutanten, ebenso wie Cyclin A oder Cdk2 durch p21^{Cip1} oder p27^{Kip1} in den Kern transloziert (Daten nicht gezeigt bzw. s. Abb. 41, 42 & 44). Dieses Phänomen trat jedoch nur bei den Cyclin E-Mutanten auf, die noch transformierende Eigenschaften hatten (s. Abb. 13, 19, 41 & 42). Die stark verkürzten Mutanten Cyclin E 1-215, - 1-250, - 1-300, - 219-395 und - 298-395 konnten nicht durch Überexpression CKIs in den Zellkern getrieben werden (s. Abb. 41, 42 & Daten nicht gezeigt).

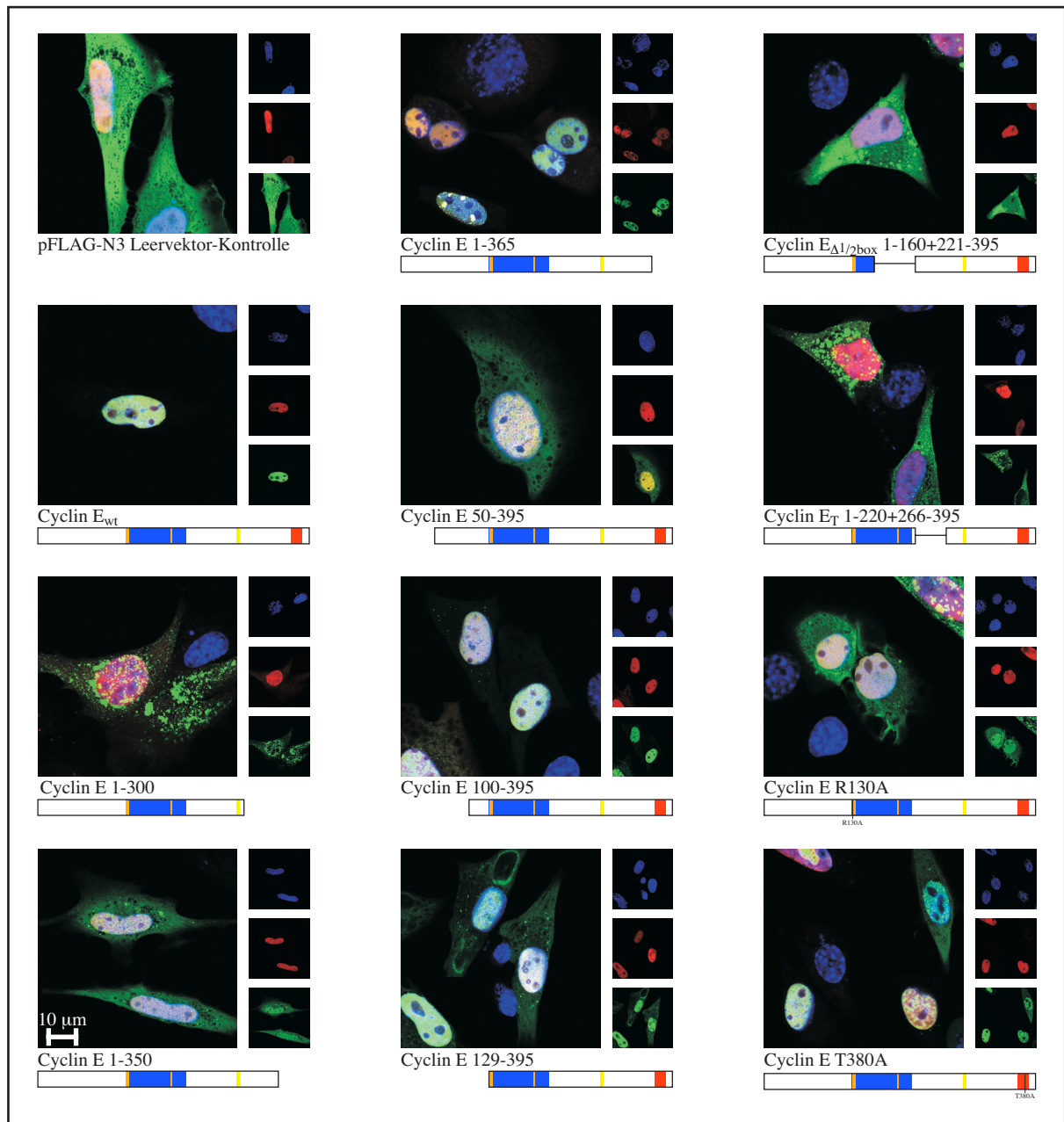


Abb. 41: p27^{Kip1}-Red1 beeinflusst die subzelluläre Verteilung von Cyclin E-Mutanten.

Fluoreszenzaufnahmen mit dem Laser-Scan-Mikroskop: Es sind repräsentative Beispiele von transient mit den angegebenen Cyclin E-Mutanten-pEGFP-N3-Plasmiden und p27^{Kip1}-pDsRed1-N3 kotransfizierten NIH3T3-Zellen gezeigt, der Balken links unten repräsentiert 10 μ m. Die Zellkerne wurden mit Hoechst-Farbstoff angefärbt. Dargestellt ist das GFP-Signal in grün, die Hoechst-Kernfärbung in blau und das Red1-Signal in rot.

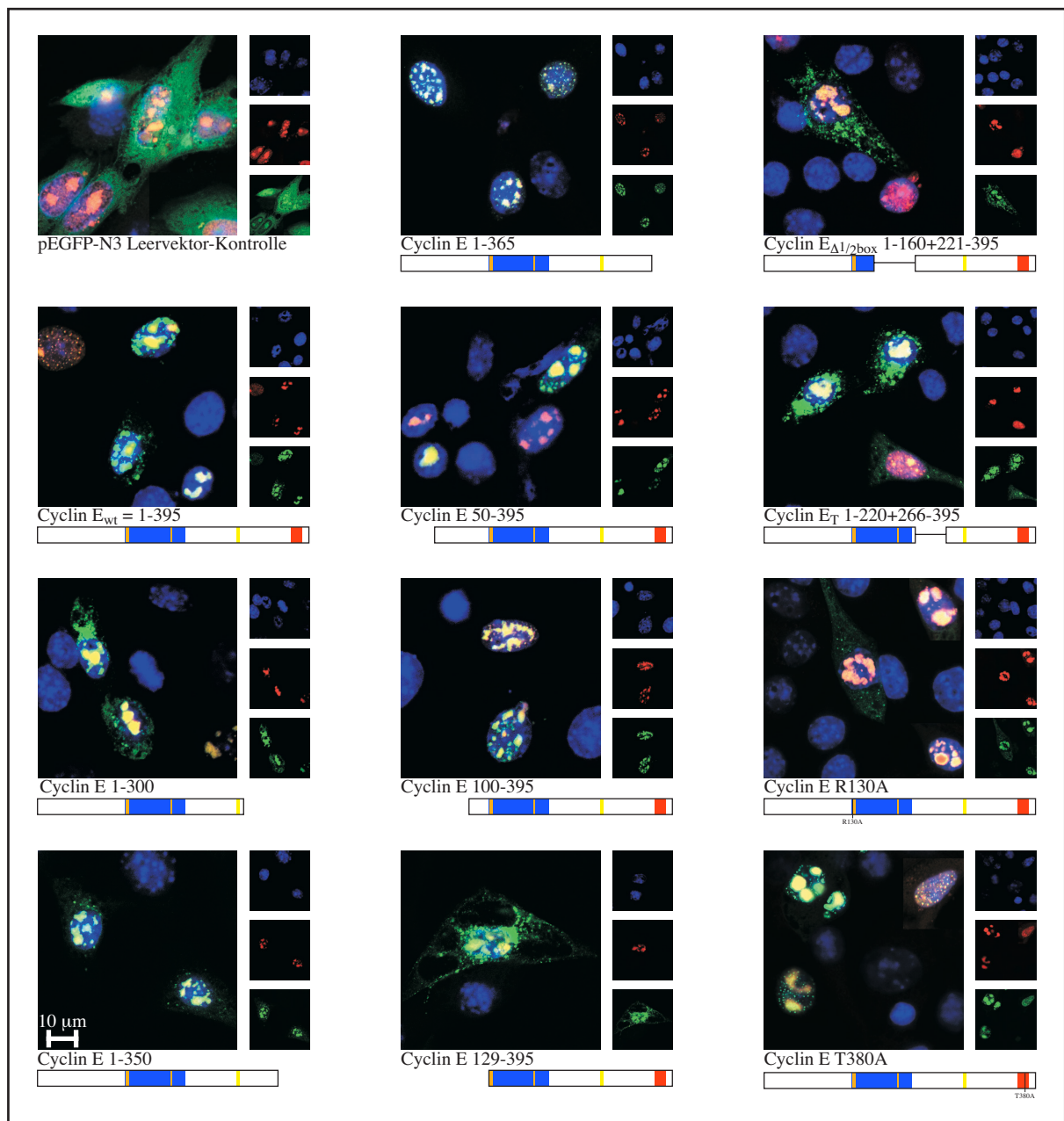


Abb. 42: p21^{Cip1}-Red1 bewirkt eine subzelluläre Umverteilung von Cyclin E-Mutanten.

Fluoreszenzaufnahmen mit dem Laser-Scan-Mikroskop: Es sind repräsentative Beispiele von transient mit den angegebenen Cyclin E-Mutanten-pEGFP-N3-Plasmiden und p21^{Cip1}-pDsRed1-N3 kotransfizierten NIH3T3-Zellen gezeigt, der Balken links unten repräsentiert 10 μ m. Die Zellkerne wurden mit Hoechst-Farbstoff angefärbt. Dargestellt ist das GFP-Signal in grün, die Hoechst-Kernfärbung in blau und das Red1-Signal in rot.

Ob die Expression von p57^{Kip2} den gleichen Effekt hat konnte nicht untersucht werden. Für Cyclin D1 wurde eine solche Umverteilung in den Nukleus nicht beobachtet (nicht gezeigt). Häufig ist eine Akkumulation von GFP-, BFP- oder Red1-Fusionsproteinen um den Zellkern herum zu beobachten. Diese kann möglicherweise auf die starke Überexpression der Proteine und die potentiell stabilisierende Wirkung der GFP-, BFP- und Red1-Proteinanteile zurückgeführt werden. Dadurch können die Proteinsortiermechanismen überlastet werden und eine Anhäufung von GFP-Fusionsproteinen in Vesikeln erfolgen. Ob es sich dabei um Teile des Golgiapparates handelt, in denen sich diese Proteine ansammeln, was auf Grund der kernnahen Lokalisation wahrscheinlich ist, konnte nicht geklärt werden.

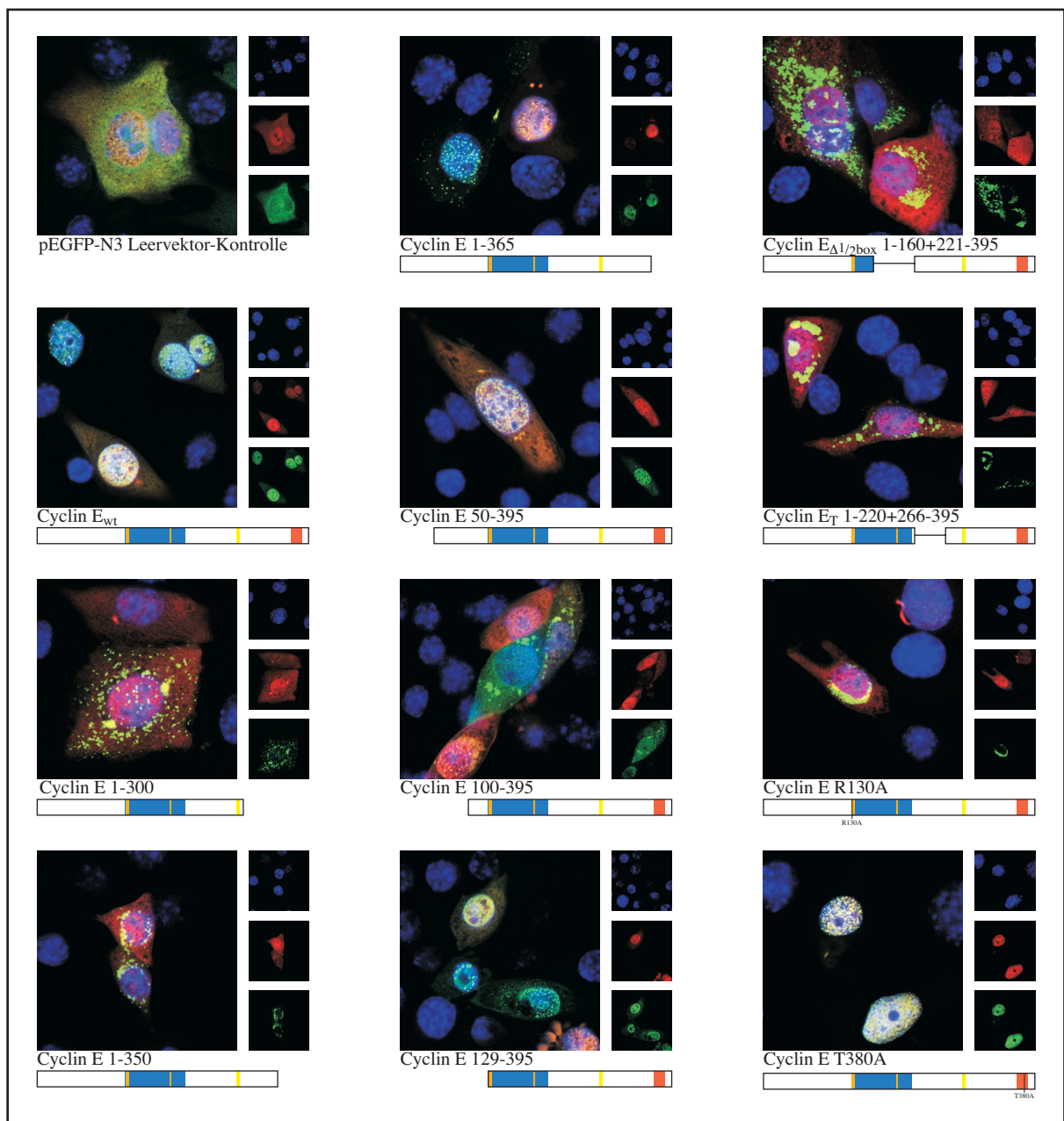


Abb. 43: Überexpression von Cyclin E-Mutanten bewirkt eine subzelluläre Umverteilung von exogenem Cdk2-Red1.

Fluoreszenzaufnahmen mit dem Laser-Scan-Mikroskop: Es sind repräsentative Beispiele von transient mit den angegebenen Cyclin E-Mutanten-GFP-Plasmiden und Cdk2-pDsRed1-N3 kotransfizierten NIH3T3-Zellen gezeigt, der Balken links unten repräsentiert 10 μm . Die Zellkerne wurden mit Hoechst-Farbstoff angefärbt. Dargestellt ist das GFP-Signal in grün, die Hoechst-Kernfärbung in blau und das Red1-Signal in rot.

Während Cdk2-GFP oder Cdk2-Red1 bei alleiniger Überexpression homogen verteilt in den transfizierten Zellen zu finden ist, wird die Lokalisation bei Koexpression von p21^{Cip1} oder p27^{Kip1} hin zu einer verstärkten nukleären Akkumulation verändert. Dieser Effekt ist nicht durch die Expression von p16^{ink4a} oder Cyclin D1, wohl aber durch Cyclin E und Cyclin A zu reproduzieren (s. Abb. 43 & Daten nicht gezeigt). Nur die im 2-Hybrid-System mit Cdk2 interagierenden Cyclin E-Mutanten (s. Abb. 25 & 29) waren in der Lage die Translokation des überexprimierten Cdk2-Red1 in den Nukleus zu stimulieren. Dabei wurden sie auch selbst in den Kern transportiert (s. Abb. 43). Es scheint sich also um einen Kotransport von Cyclin E und Cdk2 vom Zytoplasma in den Kern zu handeln.

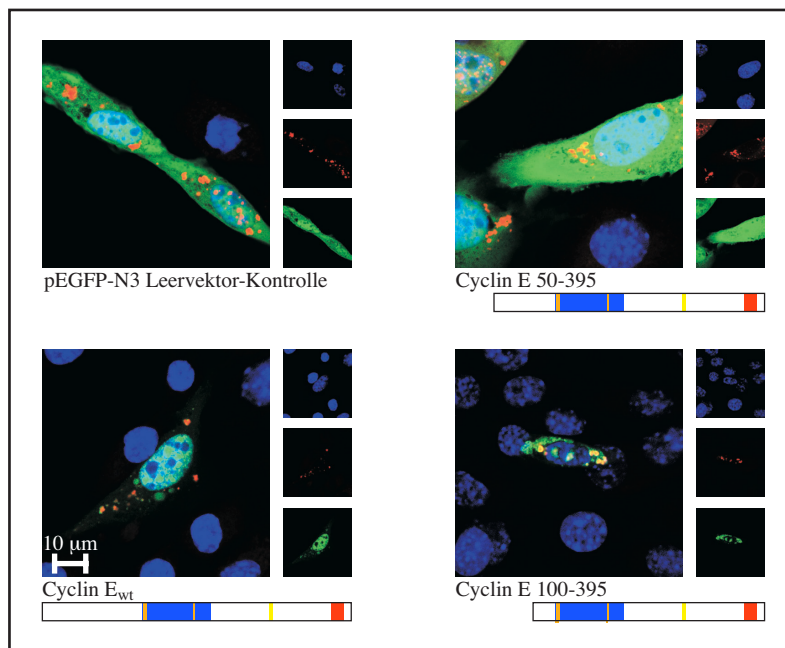


Abb. 44: Analyse der subzellulären Verteilung von Cyclin E-Mutanten bei Kotransfektion von p16^{Ink4a}-Red1.

Fluoreszenzaufnahmen mit dem Laser-Scan-Mikroskop: Es sind repräsentative Beispiele von transient mit den angegebenen Cyclin E-Mutanten-GFP-Plasmiden und p16^{Ink4a}-pDsRed1-N3 kotransfizierten NIH3T3-Zellen gezeigt, der Balken links unten repräsentiert 10 µm. Die Zellkerne wurden mit Hoechst-Farbstoff angefärbt. Dargestellt ist das GFP-Signal in grün, die Hoechst-Kernfärbung in blau und das Red1-Signal in rot.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die subzelluläre Lokalisation von zellzyklusregulatorischen Proteinen durch ihre Partnerproteine beeinflusst wird. Dabei werden Proteinkomplexe aus Cyclin/CKI, Cyclin/Cdk oder Cdk/CKI zusammen im Kern lokalisiert gefunden, wenn die Proteine aneinander binden können. Es ist also wahrscheinlich, daß die Zellzyklusregulatoren durch Kotransport in den Nukleus gelangen und nicht alle auf eigene Lokalisationssequenzen angewiesen sind.

Die durch Fluoreszenzanalysen beobachteten Beeinflussungen der subzellulären Verteilung von Cyclin E-Mutanten-GFP-Fusionsproteinen durch Cdk2, p21^{Cip1} und p27^{Kip1} bestätigen die zuvor analysierten Interaktionsfähigkeiten der Mutanten (s. Abb. 29).

2.5.2 Cyclin E-Mutanten sind in REF-Zelllinien nukleär lokalisiert

Die Verteilung der Cyclin E-Proteine innerhalb der etablierten REF-Zelllinien wurde durch indirekte Immunfluoreszenz analysiert. Dabei wurde festgestellt, daß die mit dem gegen den C-Terminus von Cyclin E gerichteten Antikörper (C-19) untersuchbaren Mutanten (Cyclin E 1-395, - 50-395, ... - $\Delta 1/2$ box, Cyclin E_T und Cyclin E T380A) alle nukleär lokalisiert waren (s. Abb. 46 & Daten nicht gezeigt). Ebenfalls waren die mit GFP fusionierten Cyclin E-Proteine (Cyclin E_{wt}-GFP, Cyclin E 50-395-GFP und Cyclin E 100-395-GFP) in den entsprechenden Zelllinien nukleär zu finden, wohingegen die gleichen Proteine in NIH3T3-Zellen exprimiert bis auf das Wildtyp Cyclin E-Protein immer zytoplasmatisch gefunden wurden (s. Abb. 40 & 46). Dadurch ist ein mit der Transformation der REF-Zellen in Verbindung stehender Mechanismus zu vermuten, der die Lokalisation der Cyclin E-Mutanten beeinflusst. Eine Überprüfung des Einflusses von Ha-Ras-V12 auf die Verteilung von Cyclin E-Mutanten in transfizierten Zellen ergab keine Veränderung der Lokalisation. Somit kann ein direkter Mechanismus durch konstitutiv aktives Ras ausgeschlossen werden.

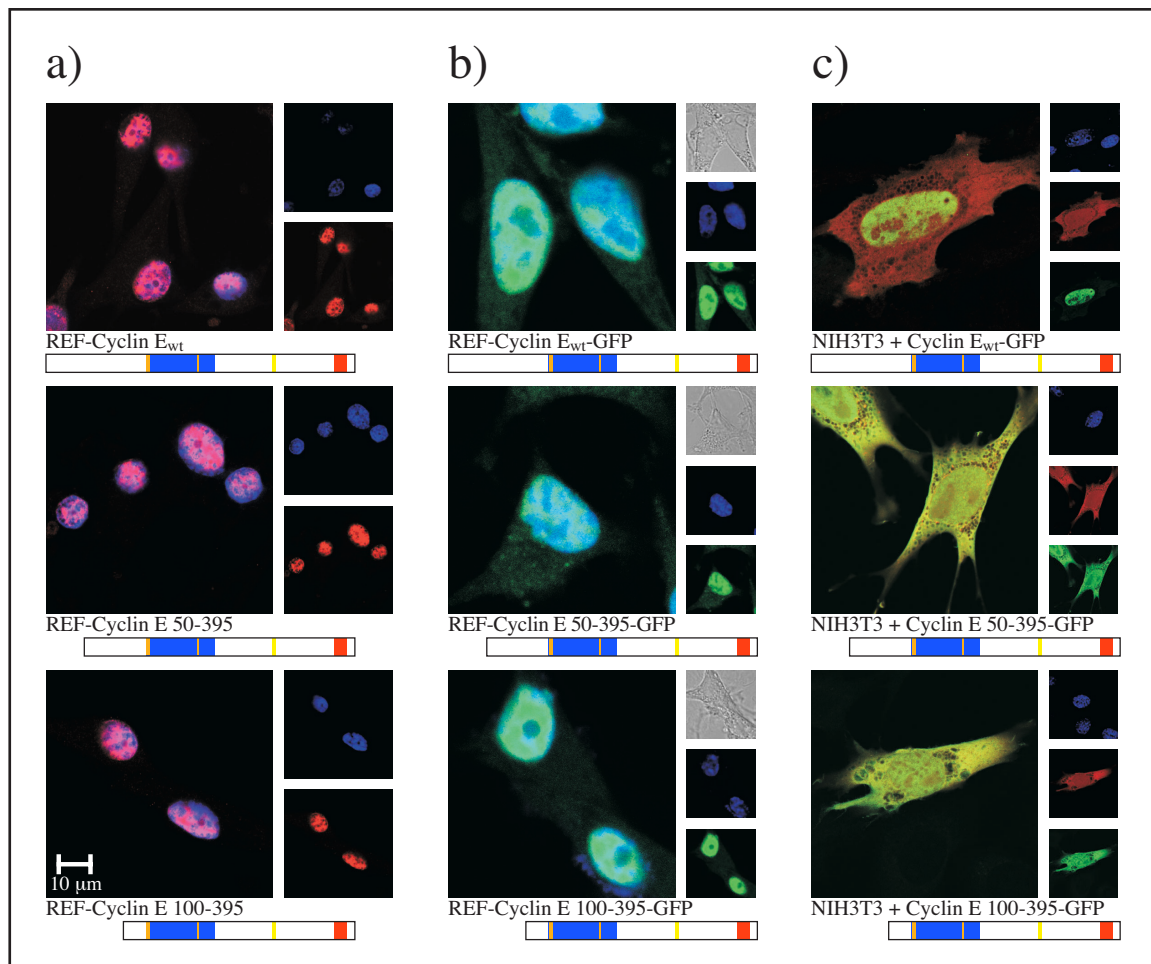


Abb. 45: Cyclin E-Mutanten sind in transformierten REF-Zellen nukleär lokalisiert.

Aufnahmen mit dem Laser-Scan-Mikroskop: Es sind repräsentative Beispiele von Ergebnissen mit Cyclin E_{wt}, Cyclin E 50-395 und Cyclin E 100-395 gezeigt, der Balken links unten repräsentiert 10 μm . **a)** Indirekte Immunfluoreszenz der angegebenen durch Cyclin E(-Mutanten) transformierten REF-Zelllinien mit α -Cyclin E (C-19) und α -Kaninchen-TRITC (rot), sowie Hoechst-Kernfärbung (blau). Als Negativkontrolle dienten nicht durch Cyclin E transformierte REF-Zelllinien oder primäre REF, in denen kein rotes Signal beobachtet wurde (nicht gezeigt). **b)** Fluoreszenzaufnahme von REF-Zelllinien, die durch GFP-fusionierte Formen von Cyclin E(-Mutanten) transformiert wurden. GFP-Signal in grün, Hoechst-Kernfärbung in blau. **c)** Fluoreszenzaufnahme von transient mit Cyclin E(-Mutanten)-GFP-Plasmiden und pDsRed1-N3 transfizierten NIH3T3-Zellen. GFP-Signal in grün, Hoechst-Kernfärbung in blau, Red1-Signale in rot.

3. Diskussion

Das zentral in die Zellzyklusregulation involvierte humane Cyclin E wurde zunächst in Komplementationsversuchen in Hefen, denen die G₁-spezifischen Cyclin-Gene CLN1-3 fehlen, gefunden (Koff, *et al.*, 1991; Lew, *et al.*, 1991). Seine Bedeutung als evolutionär konservierter Regulator des Überganges von der Ruhephase G₁ in die Synthese-Phase S des Zellzyklus, als Zielgen von E2F und als Aktivator von Cdk2 ist durch eine Vielzahl an Experimenten belegt (DeGregori, *et al.*, 1995; Duronio und O'Farrell, 1995; Geng, *et al.*, 1996; Jackson, *et al.*, 1995; Ohtani, *et al.*, 1995; Ohtsubo, *et al.*, 1995; Rempel, *et al.*, 1995). Cyclin E bindet und aktiviert Cdk2, bildet dadurch einen Kinasekomplex und übt, durch die Phosphorylierung seiner Substrate und die daraus folgende Genaktivierung, eine S-Phase initiiierende Funktion aus (Dulic, *et al.*, 1992; Koff, *et al.*, 1992).

Weiterhin gibt es sowohl experimentell als auch epidemiologisch-statistisch starke Hinweise für eine Funktion von Cyclin E in der Tumorigenese (Donnellan und Chetty, 1999). Neben der Amplifikation des humanen Cyclin E Gens *CCNE* auf Chromosom 19q12-q13 in Tumoren (Buckley, *et al.*, 1993; Demetrick, *et al.*, 1995; Keyomarsi und Pardee, 1993) ist seine teilweise dadurch bedingte Überexpression als Tumormarker für schlechte Prognosen in verschiedenen Geweben etabliert (s. 1.4 und (Donnellan und Chetty, 1999). Experimentell konnte das onkogene Potential von humanem Cyclin E in mehreren Systemen nachgewiesen werden (Bortner und Rosenberg, 1997; Haas, *et al.*, 1997; Karsunky, *et al.*, 1999).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die transformierenden Eigenschaften von Cyclin E näher zu untersuchen und den Wirkungsmechanismus von überexprimiertem Cyclin E in der Onkogenese aufzuklären. Hierzu wurde mit einer Reihe von Cyclin E-Mutanten in verschiedenen experimentellen Systemen gearbeitet und diverse Charakteristika von Cyclin E untersucht.

3.1 Transformation durch Cyclin E ist unabhängig von Cdk2-Bindung und -Aktivierung

Als zentrales Thema der vorliegenden Arbeit ist die Analyse der transformierenden Eigenschaften von Cyclin E zu sehen. Dabei stellte sich heraus, daß die meisten der eingesetzten Mutanten von Cyclin E noch in der Lage sind, in Kooperation mit Ha-Ras-V12, eine onkogene Transformation zu bewirken. Es konnte eine kritische Größe des Proteins an sich, jedoch kein definierter eng umschriebener Bereich als für diese Eigenschaften verantwortlich identifiziert werden (s. Abb. 13 & 19). Die weiteren Eigenschaften der mutierten Formen von Cyclin E (s. Abb. 19 & 29) lassen den Schluß zu, daß die Transformation durch Cyclin E sowohl von seiner Cdk2-aktivierenden als auch Cdk2-bindenden Eigenschaft unabhängig ist. Dies bestätigt die fehlende Übereinstimmung von Cyclin E Überexpression mit erhöhter Kinaseaktivität in Tumoren und im tumorbildenden, transgenen Tiermodell (Karsunky, *et al.*, 1999; Sweeney, *et al.*, 1998).

Da jedoch die Cdk2-bindungsdefiziente Punktmutante Cyclin E R130A nicht mehr mit Ha-Ras-V12 in der Transformation primärer Zellen kooperiert, muß für diese Mutante ein dominant

negativer Effekt in diesem experimentellen Umfeld oder eine weitere Funktion der Cdk2-Bindungsfähigkeit von Cyclin E postuliert werden.

Außerdem ist festzustellen, daß neben der „Cyclin-Box“ weitere flankierende Sequenzen sowohl für die Bindung von Cdk2, als auch für die Aktivierung notwendig sind. So besitzt z.B. die Mutante Cyclin E 1-300 zwar die komplette „Cyclin-Box“ inkl. angrenzender Bereiche, die für die Substratbindung notwendig sind, bindet und aktiviert die Kinase aber nicht mehr. Nur die wenig veränderten Deletionsmutanten Cyclin E 1-365 und - 50-395 aktivieren die Kinase noch, ebenso wie die Punktmutante Cyclin E T380A. Dabei sind für die übrigen Mutanten Effekte, die auf unkorrekter Faltung des mutierten gegenüber dem wt-Protein basieren, nicht auszuschließen. Die Aktivierung der Kinase kann mit der Beschleunigung der G₁-S-Phasen-Progression korreliert werden. Nur diejenigen Mutanten, welche die Kinase aktivieren, bewirken bei Überexpression auch ein vermehrtes Eintreten in die S-Phase. Generell spiegelt das Bindungsverhalten der Cyclin E-Mutanten an Cdk2 in etwa das bekannte Muster von Cyclin A-Mutanten wieder (Kobayashi, *et al.*, 1992; Lees und Harlow, 1993). Bei beiden Proteinen sind Deletionen im C-Terminus von größerer Auswirkung als im N-Terminus und interne Deletionen in der „Cyclin-Box“ verhindern eine Bindung an Cdk2.

Diese Funktion von Cyclin E-Mutanten in höheren eukaryontischen Zellen kann nicht mit ihren Fähigkeiten in der Hefe *S. cerevisiae* in Übereinstimmung gebracht werden. Da außer den oben erwähnten Mutanten auch Cyclin E 1-350, - 100-395 und - 129-395 noch in der Lage sind, den letalen Phänotyp von Δ L1-Hefen zu komplementieren (s. Abb. 16), ist davon auszugehen, daß sie noch die Hefekinese Cdc28 aktivieren können. Dies beschränkt die für Bindung und Aktivierung von Cdc28 notwendigen Bereiche des Cyclin E-Proteins auf die „Cyclin-Box“ und C-terminal von dieser gelegenen AS und stimmt mit den Ergebnissen zur Cdk2-Bindung aus der 2-Hybrid-Analyse überein.

Für die Spleißvarianten von Cyclin E bedeutet dies, daß das hier mit untersuchte Cyclin E_T ebenso wie Cyclin E_S (hier durch die Mutante Cyclin E _{Δ box} simuliert) Cdk2 nicht mehr binden und aktivieren können, was ihnen also keine physiologische Funktion in der direkten Regulation der Kinaseaktivität zuspricht (Mumberg, *et al.*, 1997; Sewing, *et al.*, 1994). Für die weiteren publizierten Spleißvarianten (s. Abb. 10) gilt, daß die N-terminal um 15 AS längere Version Cyclin E_L ebenso wie die Varianten - Δ 9, - Δ 48 und - Δ 148 wahrscheinlich die gleichen Eigenschaften haben, wie das in dieser Arbeit als Wildtyp-Protein angesehene Cyclin E 1-395 (Keyomarsi, *et al.*, 1995; Ohtsubo, *et al.*, 1995; Porter und Keyomarsi, 2000). Im Gegensatz dazu dürften die Mutanten Cyclin E_{S+ Δ 9} - Δ 97 und - Δ IN3 keine Cdk2-bindenden oder -aktivierenden Fähigkeiten und daher auch keine direkte Bedeutung für die Regulation des Zellzyklus haben, sofern diese alternativ gespleißten mRNAs überhaupt als Proteine exprimiert werden.

Neben der Amplifikation des *Cyclin E*-Gens und daraus folgender Überexpression, sowie Deregulation der Expressionskontrolle von Cyclin E in den einzelnen Stadien des Zellzyklus, ist das Auftreten von Cyclin E in Tumorzellen durch die Überexpression der wt-Form und das gleichzeitige Auftreten niedermolekularer Isoformen gekennzeichnet (Buckley, *et al.*, 1993; Donnellan und Chetty, 1999; Keyomarsi, *et al.*, 1995; Keyomarsi, *et al.*, 1994; Keyomarsi und

Pardee, 1993; Scuderi, *et al.*, 1996; Sgambato, *et al.*, 1997; Wang, *et al.*, 1996). Dies kann zum einen auf alternative Translationsinitiationsstellen und zum anderen auf die mögliche Aktivität einer noch nicht identifizierten Protease zurückgeführt werden (Harwell, *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit konnten die Ergebnisse von Harwell *et al.* insofern bestätigt werden, als daß niedermolekulare Formen von Cyclin E in transformierten Zellen beobachtet wurden (s. Abb. 31 & 32). Allerdings handelte es sich meist nur, wie auch in normalen Zellen, um ein bis zwei Formen von Cyclin E bzw. seiner Mutanten, die wahrscheinlich durch vollständige Translation der cDNAs bzw. alternative Translation beginnend an der zweiten Translationsinitiationsstelle entstanden. Dies wird durch das unterschiedliche Muster der Antikörperdetektion klar:

Der Antikörper, der den N-Terminus des Cyclin E-Proteins erkennt, detektierte immer nur eine Proteinbande, während durch den gegen das C-terminale Ende gerichteten Antikörper mehrere Banden erkannt wurden. Somit handelt es sich bei den kleineren Cyclin E-Varianten um N-terminal verkürzte Proteine. Ob diese Veränderung auf die Aktivität eines proteolytisch aktiven Enzyms oder auf die Translation beginnend mit einem zweiten Start-Codon zurückzuführen ist, konnte nicht abschließend geklärt werden. Dazu müßten Cyclin E-cDNAs, bei denen die alternativen Translationsinitiationsstellen mutiert wurden, generiert und ihre Expression analysiert werden. Die These, daß die Prozessierung des Cyclin E-Proteins in transformierten Zellen eine andere sein muß als in primären, kann bestätigt werden, da durchaus kleinere Formen der überexprimierten Cyclin E-Proteine gefunden wurden, deren Anteil aber gering ist und durch die starke Überexpression der vollständigen Proteine überdeckt wird. Die für solch eine N-terminale Modifikation in Frage kommende Protease scheint in diesen Zellen nicht ausreichend aktiv zu sein um die großen Mengen an Cyclin E-Protein zu verarbeiten. Da in der Studie von Harwell *et al.* nur verkürzte Isoformen von Cyclin E bis zu einer Größe von ca. 37 kDa als niedermolekulare Isoformen gefunden wurden (was einem Verlust von weniger als den ersten 90 AS entspricht), ist es durchaus möglich, daß diese funktionell sind. Den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu Folge sind auch N-terminal verkürzte Cyclin E-Proteine noch in der Lage, Cdk2 zu aktivieren bzw. CKIs zu binden. Somit könnten diese trunkeierten Isoformen von Cyclin E in den Zellzyklus der transformierten Zellen regulierend eingreifen. Zu erwähnen sind Publikationen die eine N-terminal aktive Protease für Cyclin A beschreiben (Bastians, *et al.*, 1998; Yam, *et al.*, 2001), die wahrscheinlich durch bakterielle Verunreinigung in die Experimente eingebracht wurde und so falsche Ergebnisse lieferte. Ein solches endogenes Enzym das Cyclin E in der von Harwell *et al.* beschriebenen Weise modifizieren kann, ist weiterhin noch zu entdecken. Um ein solches Protein zu identifizieren, müßte eine Interaktionssuche mit einer nicht mehr spaltbaren Mutante von Cyclin E in einer 2-Hybrid-Analyse durchgeführt werden. Da Cyclin E aber in Hefen toxisch ist, wäre dieser Versuch nur mit einer N-terminal deletierten, z.B. Cyclin E 50-395, und gleichzeitig an der/den potentiellen Spaltstelle(n) mutierten Cyclin E-cDNA in dem cln1,2,3- Hefestamm $\Delta L1$ möglich, da Cyclin E 50-395 in diesen Hefen bei Überexpression nicht toxisch wirkt. Alternativ könnte die Cdk2-bindungsdefiziente Punktmutante Cyclin E R130A als Ausgangs-cDNA gewählt werden, da ihre Überexpression in wt-Hefen nicht stört, allerdings muß dann die Protease-Bindung unabhängig von der Cdk2-Bindung sein, damit die Suche erfolgreich sein kann.

3.2 p27^{Kip1}-Inaktivierung ist notwendig für die Tumorigenität von Cyclin E

Da in den verwendeten Ratten Embryo Fibroblasten durch Immun Blot-Analyse keine Expression von p21^{Cip1} und nur eine geringe von p57^{Kip2} nachgewiesen werden konnte, ist das stark exprimierte p27^{Kip1} das wichtigste CKI der Cip/Kip-Familie in diesen Zellen. Somit kommt diesem Protein die einzige negativ zellzyklusregulatorische Bedeutung im Bezug zur Cyclin E mediierten Transformation zu. Zwar gibt es Befunde, nach denen ein stark aktivierter Ras-Signalweg in erhöhter Expression von p21^{Cip1} resultiert (Kivinen und Laiho, 1999; Sewing, *et al.*, 1997; Woods, *et al.*, 1997), doch konnte dies in den untersuchten REF-Zelllinien nicht verifiziert werden. Da dieser Effekt hauptsächlich über den Raf-MAPK-Weg gesteuert wird und abhängig von der Signalstärke ist, könnte das Signal des Ha-Ras-V12 in diesem System nicht stark genug sein, um eine solche Induktion zu bewirken. Hingegen ist die in den meisten der analysierten REF-Zelllinien verhältnismäßig zu untransformierten primären REF-Zellen erniedrigte Expression von p27^{Kip1} zu bemerken. Diese verringerte Menge an p27^{Kip1}-Protein ist möglicherweise auf den konstitutiv aktiven Ras-Signalweg zurückzuführen, von dem bekannt ist, daß er p27^{Kip1} durch transkriptionelle Repression über die Proteinkinase B (PKB) negativ reguliert (Medema, *et al.*, 2000).

Jedoch kann auch erhöhte Aktivität von Cyclin E/Cdk2, die wiederum verschiedene Ursachen haben kann (Cyclin D1, SV40largeT, E1A, Myc-Überexpression), zu vermehrtem Abbau von p27^{Kip1} führen und dadurch die Proliferation fördern. Zumindest scheint eine Verringerung der p27^{Kip1}-Proteinmenge die Transformation der Ratten Embryo Fibroblasten zu begünstigen. Die Kooperation von überexprimiertem Cyclin E und Verlust von p27^{Kip1} führt auch in Mäusen zu vermehrter Tumorentstehung (H. Karsunky pers. Mitteil.), so daß es sich bei dieser Beeinflussung des Zellzyklus um ein grundlegendes Prinzip der Tumorigenese handeln könnte. Da keine Beeinflussung der Phosphorylierung von Pocketproteinen in den untersuchten Zelllinien zu beobachten war (s. Abb. 31) und auch nicht kinaseaktivierende Cyclin E-Mutanten noch transformierend wirken, kann ein Transformationsmechanismus über Inhibition der Pocketproteine wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Da die Kinaseaktivierung ausgeschlossen werden kann und auch keine Behinderung des Abbaus der endogenen zellzyklusregulatorischen Proteine vorzuliegen scheint, bleibt die Funktion der p27^{Kip1}-Inaktivierung, durch Bindung, Umverteilung auf andere Cdk-Komplexe, verstärkte Phosphorylierung und folgenden Abbau, als wahrscheinlichster Beitrag den Cyclin E zur onkogenen Transformation im Zusammenspiel mit Ha-Ras-V12 leistet. Weiterhin nimmt das onkogene Transformationspotential (s. Abb. 13 & 19) mit abnehmender Interaktionsfähigkeit, z.B. mit CKIs (s. Abb. 25, 27 & 29), ab. Somit korreliert bei den terminalen deletierten Cyclin E-Mutanten die Bindungsfähigkeit mit dem onkogenen Potential. Dies läßt auf einen Transformationsmodus schließen, der auf der Bindung eines oder mehrerer Partnerproteine von Cyclin E, wahrscheinlich p27^{Kip1}, beruht. Die internen Deletionsmutanten Cyclin E_{Δbox}, Cyclin E_{Δ1/2box} und Cyclin E_T bestätigen diese Vermutung nicht direkt. Durch ihre relativ geringen onkogenen Potentiale (s. Abb. 13), die mit ihrer fehlenden Interaktionsfähigkeit mit bekannten Proteinen korreliert (s. Abb. 25, 27 & 29), wird jedoch die Notwendigkeit der CKI-Inhibition betont.

Genauere Analysen des p27^{Kip1}- und evtl. des p57^{Kip2}-Status in verschiedenen transformierten Zelllinien würde die Implikation der CKI-Inaktivierung und den genauen Modus derselben weiter erhellen.

3.3 Die Lokalisation von Cyclin E ist abhängig von CKIs

Alle bisherigen Publikationen belegen eine Lokalisation des Cyclin E_{wt}-Proteins im Zellkern der untersuchten Zellen bzw. Gewebe (Moore, *et al.*, 1999; Ohtsubo, *et al.*, 1995). Die Analyse der Cyclin E-Aminosäuresequenz ergab eine unvollständige, basische, putative Kernlokalisierungssequenz (NLS). Diese erschien als mögliches, funktionelles Element, da Moore *et al.* über den Kerntransport von Cyclin E nach dem Schema eines die klassische, basische NLS beinhaltenden Proteins berichten, das über Bindung an die α -Adaptor Untereinheit des Importin- α/β Heterodimers in den Kern gelangt (Moore, *et al.*, 1999). Die Analysen der subzellulären Lokalisation der Cyclin E-Mutanten ergab, daß diese N-terminale, putative NLS (AS 15-17 = KRK) nicht allein für die Lokalisation des Proteins verantwortlich sein kann, da außer den Mutanten Cyclin E 1-365 und - T380A alle anderen Mutanten als GFP-Fusionsproteine im Cytoplasma und nicht im Zellkern lokalisiert gefunden wurden. Da eine punktuelle Mutation dieser Stelle von KRK nach AAA weder eine Änderung der Lokalisation, noch eine funktionelle Beeinträchtigung des Proteins in NIH3T3-Zellen hervorruft (Kelly, *et al.*, 1998), ist nicht von einer Bedeutung dieser AS-Sequenz für die Lokalisation oder Funktion von Cyclin E auszugehen.

Allerdings scheinen andere Eigenschaften des Cyclin E-Proteins für die Lokalisation wichtig zu sein. Da auch die Cdk2-bindungsdefiziente Punktmutante Cyclin E R130A als GFP-Fusionsprotein nicht mehr im Nukleus zu finden ist, kann davon ausgegangen werden, daß die Cdk2-Bindung eine der wichtigen Eigenschaften ist. Weitere Versuche zeigen daß die Mutante Cyclin E 50-395 zwar nicht korrekt im Zellkern lokalisiert ist, dennoch Cdk2 bindet und aktiviert und eine verstärkte G₁-S-Phasen-Progression bewirken kann. Also wäre die Cdk2-Bindung und -Aktivierung nicht allein für die Lokalisation verantwortlich. Der Befund, daß gleichzeitige Überexpression von Cdk2, Cdk2-Red1 oder Cdk2-BFP die Lokalisation von Cyclin E 50-350, ebenso wie der übrigen Cdk2-bindenden Cyclin E-Mutanten, verändert (s. 2.5.1), spricht für einen Dosiseffekt. Durch die Überexpression der Cyclin E-Mutanten liegt endogenes Cdk2 nicht mehr in ausreichender Menge vor und der Kotransport in den Nukleus wird gehemmt. Möglicherweise ist die Expression der Cycline in REF-Zellen durch den Einsatz des LTR-Promotors gerade so groß, daß die endogenen Cdk2-Menge ausreicht um die beobachtete nukleäre Lokalisation der Cyclin E-Mutanten zu gewährleisten.

Ebenso beeinflusst die Koexpression der wt oder fusionierten cDNAs für die CKIs p21^{Cip1}, p21^{Cip1}-Red1 oder p27^{Kip1}-Red1 die Lokalisation der Cyclin E-Mutanten dahingehend, daß sie dann nicht mehr im Cytoplasma, sondern im Kern lokalisiert gefunden werden. Da dies für alle Mutanten, die transformierend wirken, zu beobachten ist, könnte hierin ein entscheidender Mechanismus der Transformation durch Cyclin E liegen. Kontrollen mit p16^{Ink4a}-Red1, Cyclin D1-Red1 oder Cdk4-Red1 ergaben keinen Einfluß dieser Zellzyklusregulatoren auf die

subzelluläre Verteilung der Cyclin E-Mutanten, was einen spezifischen Effekt von p21^{Cip1} und p27^{Kip1} unterstreicht.

Da die (Immun-)Fluoreszenz-Analyse der Lokalisation der Cyclin E-Mutanten in etablierten REF-Zelllinien eine durchgängig nukleäre Verteilung aller transformierenden Mutanten ergab, ist anzunehmen, daß eine Veränderung während der Transformation diese subzelluläre Anordnung verursacht. Da innerhalb der vorliegenden Arbeit die Lokalisation der Cyclin E-Mutanten in primären REF-Zellen nicht untersucht werden konnte, ist jedoch ein Zelltyp-spezifischer Effekt nicht auszuschließen. Klärung würden Analysen der Lokalisation von Cyclin E-Mutanten in untransformierten REF-Zellen durch (Immun-)Fluoreszenz-Untersuchungen erbringen.

Eine Beeinflussung der subzellulären Verteilung der Cyclin E-Mutanten durch Signale des konstitutiv aktiven Ha-Ras wäre denkbar, konnte aber in ersten Versuchen nicht beobachtet werden. Diese können zu einer Erhöhung der p21^{Cip1}-Expression führen (Kivinen und Laiho, 1999; Sewing, *et al.*, 1997; Woods, *et al.*, 1997) und würden dadurch, wie experimentell gefunden, die Cyclin E-Proteine in den Kern umverteilen. Jedoch konnte durch Immun Blot-Analyse weder in den untransformierten REF-Zellen, noch in einer der etablierten Zelllinien p21^{Cip1}-Expression detektiert werden. Trotzdem ist der konstitutiv aktive Ras-Signalweg als Auslöser dieser Protein-Umverteilung nicht auszuschließen.

Da der Effekt der Überexpression der CKIs, wie auch in der vorliegenden Arbeit belegt, hauptsächlich in einem Arrest während der G₁-Phase liegt, ist eine mögliche, zellzyklusabhängige Verteilung der Cyclin E-Mutanten nicht auszuschließen. Die Publikation von Juan und Cordon-Cardo (2001) belegt eine solche, zellzyklusabhängige Verteilung des Cyclin E_{wt}-Proteins innerhalb der Zelle und des Zellkerns. Dabei wird Cyclin E während der G₁-Phase in den Nukleus und während der G₁-S-Transition verstärkt in den Nukleolus transportiert, von wo es für die restliche Dauer des Zellzyklus wieder in das Zytoplasma gelangt und degradiert wird. In wieweit diese Unterverteilungen innerhalb des Zellkerns nur Folgen der regulierten Cyclin E-Expression sind, ist nicht bekannt, daher bleibt die postulierte Funktion des Nukleolus in der Verteilung des Cyclin E-Proteins weiter zu untersuchen. Im Gegensatz zu den von Juan und Cordon-Cardo publizierten Daten konnte in der vorliegenden Arbeit bei Kotransfektion mit einem CKI keine Lokalisation der Cyclin E-Mutanten in den Nukleoli beobachtet werden. Vielmehr zeigen die Analysen, daß diese subnukleäre Struktur von Cyclin E ausgespart wurde. Dies könnte auf einen Arrest in der G₁-Phase zurückzuführen sein, der eine Umverteilung in die Nukleoli während der G₁-S-Transition verhindert. Die Tatsache, daß die normal im Zellkern lokalisierten Cyclin E-Mutanten und der Wildtyp auch in einigen Fällen in den Nukleoli zu sehen sind und bei Koexpression von p21^{Cip1} oder p27^{Kip1} die Nukleoli immer ausgespaart bleiben, unterstützt diese Theorie.

Folglich könnte die Mißlokalisierung der Cyclin E-Mutanten im Cytoplasma eine Folge ineffizienten Transportes sein, die während eines G₁-Arrestes durch Überexpression eines CKI aufgehoben wird, da die Zelle genügend Zeit zum Transport erhält, aber auf Grund des Arrests in G₁ nicht bis in die Nukleoli weitergeführt werden kann. Dieser Theorie widerspricht allerdings der fehlende Effekt der Koexpression von p16^{Ink4a}, die zwar auch einen G₁-Arrest auslöst, aber nicht die Lokalisation der Mutanten beeinflusst. Für den Einfluß eines G₁-Arrests auf die Lokalisation spricht, daß auch die Mutanten mit internen Deletionen, Cyclin E_T, -Δ_{box} und -

$\Delta 1/2_{\text{box}}$, bei Koexpression von p21^{Cip1} oder p27^{Kip1} in den Nukleus gelangen, obwohl sie diese Proteine in anderen Versuchen nicht binden können, was einem Effekt durch direkte Bindung von p21^{Cip1} oder p27^{Kip1} an Cyclin E-Mutanten widerspricht.

Eine genaue Bewertung des Einflusses von p21^{Cip1} oder p27^{Kip1} kann hier nicht erfolgen, es wären dafür weitere Experimente, z.B. mit Red1-fusionierten Proteinen wie Importin- α oder Nukleolin, notwendig um den Transport von Cyclin E und seinen Mutanten in und innerhalb des Zellkerns genauer aufzuklären.

Die Funktion der Spleißvarianten von Cyclin E, Cyclin E_T und Cyclin E_S, bleibt auch vor dem Hintergrund ihrer Lokalisation im Cytoplasma weiter aufzuklären. Da sie weder Cdk2 noch die CKIs p21^{Cip1} und p27^{Kip1} binden können, sowie im Cytoplasma lokalisiert sind, ist eine Funktion in der Zellzyklusregulation auf bisher bekanntem Wege auszuschließen. Möglicherweise handelt es sich bei diesen, wie auch bei anderen in letzter Zeit publizierten Spleißvarianten (Keyomarsi, *et al.*, 1995; Mumberg, *et al.*, 1997; Porter und Keyomarsi, 2000; Sewing, *et al.*, 1994), um Artefakte bzw. unkontrollierte Spleißvorgänge, deren Produkte bislang nur auf mRNA-Ebene, aber nicht als exprimierte Proteine nachgewiesen werden konnten. Die Unterscheidung von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Cyclin E in der Prozessierung durch verschiedene SCF-Komplexe (Singer, *et al.*, 1999; Winston, *et al.*, 1999) könnte eine bislang nicht untersuchte Bedeutung für die Spleißvarianten des Cyclin E-Proteins haben, was aber noch nicht untersucht wurde. Weitere Untersuchungen zur Interaktionsfähigkeit mit anderen möglichen Partnerproteinen wie z.B. pRb, p107, E2F-5 oder Cullin 3 könnten die potentiellen Funktionen dieser Spleißvarianten in der Regulation des Zellzyklus näher beschreiben.

3.4 Neue Eigenschaften von Cyclin E in der Regulation der Mitose

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss von Cyclin E auf die Eigenschaften der durch seine Überexpression gewonnenen REF-Zelllinien lassen Spielraum für Spekulationen über andere Funktionen von Cyclin E als die bislang bekannten. Zum einen ist eher unerwartet, daß die Behandlung mit Mimosin, das eine Arretierung in der G₁-Phase bewirkt, auch die Cyclin E transformierten Zellen negativ beeinflußt, obwohl durch die Cyclin E-Überexpression ein starkes Signal zum Durchlaufen der G₁- in die S-Phase vorliegt. Zum anderen ist noch erstaunlicher, daß manche Cyclin E-REF-Zelllinien eine Resistenz gegenüber einem Block in der Mitose durch Nocodazol oder Colcemid aufweisen, obwohl Cyclin E in der M-Phase keine bekannte Funktion hat. Da nicht alle Cyclin E transformierten Zelllinien diesen Phänotyp aufweisen sind klonale Effekte nicht auszuschließen. Auf Grund der Tatsache, daß nur die Cyclin E-Mutanten, die noch Cdk2 aktivieren können, diesen Phänotyp hervorrufen, kann aber ein spezifischer Effekt durch die Aktivierung einer Kinase, Cdk2 oder auch Cdk1, angenommen werden. Diese ungewöhnliche Aktivierung zum „falschen“ Zeitpunkt würde ein Durchlaufen der Mitose unabhängig von anderen Kontrollmechanismen erlauben und die mangelnde Arretierung durch die chemische Hemmung der Mikrotubulopolymerisation erklären. Danach sind Chromosomenaberrationen und Polyploidien in der Folge zu erwarten. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, aber in anderen Arbeiten konnte eine Auswirkung der Cyclin E-Überexpression auf die Ploidie von transformierten REF-Zellen und die genomische Stabilität in immortalisierten REF-Zellen und humanen Brustdrüsenepithelzellen nachgewiesen

werden (Haas, *et al.*, 1997; Spruck, *et al.*, 1999). Dies unterstützt die These einer möglichen Funktion von Cyclin E in der Kontrolle der Mitose. Weitere Experimente mit anderen Chemotherapeutika wie Vinca-Alkaloiden oder Taxol, die ebenfalls den Aufbau des Mikrotubuli-Netzwerks stören, würden dieses Phänomen eventuell bestätigen und mögliche Implikationen für die Tumorbehandlung aufzeigen.

Die Bedeutung der Kontrollpunkte in der M-Phase für die Tumorentstehung ist durch den unmittelbaren Einfluß auf die korrekte Chromosomenzahl und -verteilung immens, dabei werden die molekularen Mechanismen dieser „checkpoints“ zunehmend aufgeklärt (Wassmann und Benezra, 2001). Die unmittelbare Verbindung von Cyclin E mit dem M-Phase-Kontrollpunkt, ergibt eine neue Möglichkeit der tumorigenen Wirkung von Cyclin E, die auch die Identifikation neuer Substrate für Cyclin E/Cdk2 und neue Daten für die Tumorthherapie möglich erscheinen lassen. Ein denkbare Szenario wäre z.B., daß überexprimiertes Cyclin E einen aktiven Kinasekomplex in der M-Phase bildet, der dann in die Regulation des APC/C eingreift und dadurch die Funktion von Cyclin B1/Cdk1 verfrüht ersetzt und die Segregation der Chromosomen nicht erst in der Meta-Ana-Phasen-Transition beginnt sondern fälschlicherweise zu früh. Dadurch würden ungleichmäßige Verteilungsmuster der Chromosomen entstehen und zu Aneuploidien beitragen. Diese Wirkung könnte z.B. über Mad2 ausgeübt werden, einen Inhibitor des APC/C, dessen Fehlen mit Tumorbildung und Chromosomeninstabilität verbunden ist (Dobles, *et al.*, 2000; Michel, *et al.*, 2001). Wenn Cyclin E den Abbau von Mad2 durch dessen Kinisierung beschleunigen und dadurch die APC/C-Aktivität verfrüht aktivieren würde, könnte ein solches Phänomen erklärt werden.

Weiterhin wäre die Auswirkung einer erhöhten Aktivität von Cyclin E/Cdk2 auf den Status des Substrats Nucleophosmin und damit auf die Replikation der Zentrosomen denkbar, die dann Einfluß auf die Verteilung der Chromosomen bei der Zellteilung hat. Eine beschleunigte Zentrosomenreplikation kann nicht nur mit der durch Cyclin E hervorgerufenen genetischen Instabilität (Haas, *et al.*, 1997; Spruck, *et al.*, 1999), sondern auch mit dem Einfluß von Cyclin E auf die M-Phase-Kontrolle in Verbindung gebracht werden.

Um die möglichen M-Phase-Auswirkungen von Cyclin E zu bestätigen, sind aber noch entscheidende Untersuchungen durchzuführen, die eine Bestätigung oder ein Verwerfen eines der zuvor beschriebenen Mechanismen ergeben können.

3.5 Perspektive

In dieser Arbeit wurde die transformierende Eigenschaft von Cyclin E als Protoonkogen als von seiner direkten physiologischen Funktion unabhängig beschrieben. Somit werden die sekundären Eigenschaften von überexprimiertem Cyclin E als für die Transformation notwendige Charakteristika etabliert.

Neben den bekannten Eigenschaften von humanem Cyclin E konnten auch Teilaspekte seiner Lokalisation und damit seiner Funktion innerhalb der Zelle untersucht werden. Dabei wird der genaue Mechanismus, durch den Cyclin E in den Zellkern gelangt noch Gegenstand weiterer Analysen sein müssen, die möglicherweise Aufschluß über den generellen Transportmechanismus von G₁-Phase-Regulatoren erbringen werden. Dabei wäre der Einsatz

der FRET-Technik mit an YFP und CFP fusionierten Proteinen denkbar, um Interaktionen *in vivo* direkt mit dem Laser-Scan-Mikroskop zu analysieren.

Außerdem wäre das Auffinden spezifischer Interaktionspartner der Cyclin E-Spleißvarianten Cyclin E_T und Cyclin E_S mit Hilfe eines Hefe-2-Hybrid-Screens von Interesse. Da für diese beiden Varianten bislang keine Interaktion mit bekannten Proteinen gezeigt werden konnten, sind unbekannte Partnerproteine zu vermuten, die in einer solchen Suche identifiziert und charakterisiert werden könnten, weil diese Cyclin E-Formen in der Hefe nicht toxisch wirken.

Bemerkenswert sind die Eigenschaften, die Cyclin E den transformierten Zellen verleiht und die dadurch mögliche Implikation von Cyclin E in die Regulation der M-Phase. Neben der hierdurch möglichen Erklärung der Polyploidie von Cyclin E transformierten Zellen ist eine Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Cyclin E in der Mitose von großem Interesse für weitere Studien.

Ein weiteres Ziel wird es sein, die Kenntnisse über die Mechanismen der onkogenen Transformation in neue therapeutische Konzepte einfließen zu lassen, die dann auf die Eigenschaften des Tumors passend ausgerichtet werden können. Dabei sind im Kontext von G₁-Phase-Regulatoren Ansätze mit gentherapeutischen Maßnahmen z.B. zur Expression von CKIs oder Peptiden die den funktionellen Domänen der CKIs ähneln, ebenso wie von neuen Hemmstoffen z.B. der Cyclin abhängigen Kinasen denkbar und werden auch schon durchgeführt. Ebenso wird die chemotherapeutische Behandlung von zuvor molekularbiologisch, durch DNA-Chip- oder Proteinexpressions-Analyse, untersuchten Tumoren durch neue Agentien vereinfacht, wenn die Wirkprinzipien und genauen Zielmoleküle bekannt sind.

Durch die Analysen der strukturellen Grundlagen der Substraterkennung von Cyclinen und Cdks (Brown, *et al.*, 1999; Endicott, *et al.*, 1999; Kelly, *et al.*, 1998; Schulman, *et al.*, 1998) ist im Zusammenhang mit den Analysen von Kristallstrukturen beteiligter Proteine mit der Identifikation weiterer Substratmoleküle zu rechnen. Die anschließende Aufklärung ihrer Funktion könnte auch mögliche weitere Erklärungen des onkogenen Transformationsmechanismus von überexprimiertem Cyclin E ergeben.

4. Zusammenfassung

Das zentral in die Zellzyklusregulation involvierte humane Cyclin E wurde zunächst durch Komplementationsversuche in Cyclin-defizienten Hefen gefunden. Seine Bedeutung als evolutionär konservierter Regulator des Überganges von der Ruhephase G_1 in die Synthesephase S des Zellzyklus, als Zielgen von E2F und als Aktivator von Cdk2 ist durch eine Vielzahl an Experimenten belegt. Cyclin E bindet und aktiviert Cdk2, bildet dadurch einen Kinasekomplex und übt, durch die Phosphorylierung seiner Substrate und die daraus folgende Genaktivierung, eine S-Phase initiiierende Funktion aus.

Weiterhin gibt es sowohl experimentell als auch epidemiologisch-statistisch starke Hinweise für eine Funktion von Cyclin E in der Tumorigenese. In humanen Tumoren ist neben der Amplifikation des Cyclin E Gens *CCNE* auf Chromosom 19q12-q13, seine teilweise dadurch bedingte Überexpression als Tumormarker für schlechte Prognosen in verschiedenen Geweben etabliert. Experimentell konnte das onkogene Potential von humanem Cyclin E in mehreren Systemen nachgewiesen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die transformierenden Eigenschaften von Cyclin E näher zu untersuchen und den Wirkungsmechanismus von überexprimiertem Cyclin E in der Onkogenese aufzuklären. Hierzu wurde mit einer Reihe von Cyclin E-Mutanten in verschiedenen experimentellen Systemen gearbeitet und diverse, bekannte und neue Charakteristika von Cyclin E untersucht.

Es wurde festgestellt, daß die kinaseaktivierende Funktion von Cyclin E zwar essentiell für die Stimulation der Zellzyklusprogression, jedoch nicht unbedingt für die onkogene Transformation notwendig ist. Außerdem ist die Bindung von Cdk2 durch Cyclin E-Mutanten nicht mit der Aktivierung der Kinase gleichzusetzen. Zudem konnte der Bereich des Cyclin E-Proteins, der für die Interaktion mit allen untersuchten Bindungspartnern (Cdk2, p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p130 und p45^{Skp2}) notwendig ist, auf die zentralen Aminosäuren 129-350, die auch die komplette „Cyclin-Box“ und die wichtige Aminosäure R130 beinhalten, eingeschränkt werden. Da das onkogene Potential der untersuchten Cyclin E-Mutanten und ihre Interaktionsfähigkeit mit Partnerproteinen weitgehend übereinstimmen, ist die onkogene Wirkung des überexprimierten Cyclin E-Proteins auf die Inhibition der CKIs zurückzuführen. Dem N-Terminus des Proteins konnte insgesamt keine Funktion zugeordnet werden, während der C-Terminus für den Abbau des Proteins und die Aktivierung von Cdk2 wichtig ist. Für die Spleißvarianten Cyclin E_T und Cyclin E_S konnte keine der untersuchten Interaktionen nachgewiesen werden, was ihre Funktion im Zellzyklus und den Mechanismus der durch diese Proteine vermittelten onkogenen Transformation weiter offen läßt.

Bei Überexpression werden die meisten Cyclin E-Mutanten im Zytoplasma akkumuliert gefunden. Dieses Verteilungsmuster innerhalb einer Zelle kann durch Koexpression von Partnerproteinen zu Gunsten einer nukleären Lokalisation verschoben werden. Die Steuerung der subzellulären Lokalisation von Cyclin E unterliegt nicht einem klassischen Kernlokalisierungssignal, sondern beruht auf einer oder mehrerer kooperativer Bindungen von Cyclin E an Cdk2 und/oder p21^{Cip1} bzw. p27^{Kip1} und nachfolgendem Kotransport.

Weiterhin wurden Hinweise für eine mögliche Implikation von Cyclin E in die Regulation der M-Phase des Zellzyklus gefunden.

5. Material & Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 eingesetzte Reagenzien & Materialien

Sofern nicht anders vermerkt wurden Standardreagenzien der Firmen Merck Eurolab, Darmstadt; Roth, Karlsruhe oder Sigma-Aldrich, Deisenhofen; verwendet. Allgemeiner Laborbedarf wurde von Eppendorf, Hamburg; Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf oder Roth, Karlsruhe bezogen.

Radioaktive Verbindungen (^{125}I -Methionin, ^{32}P - γ -ATP etc.) wurden von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg geliefert.

Röntgenfilme: Kodak BioMax MR, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Plastikwaren für die Zellkultur: Nunc, Wiesbaden

5.1.2 Laborgeräte

Bioimager:	Fujifilm BAS-1500, Raytest, Straubenhardt
Blotkammer:	Elektroblotkammer Maxi, v. Keutz, Reiskirchen
Computer:	Apple Macintosh
Drucker:	Lexmark Optra R ⁺ , Epson Stylus Photo 750, Apple Macintosh Laserwriter 16/600 PS
Durchflußzytometer:	FACScan Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg FACScan Vantage, Becton Dickinson, Heidelberg
Elektroporationsgerät:	Gene pulser II, Bio-Rad, München
Gelkammern:	Elektrophoresekammer Mini + Maxi, v. Keutz, Reiskirchen (wide) Mini-SubCell GT, Bio-Rad, München
Geltrockner:	Model 563 Gel Dryer, Bio-Rad, München
Inkubatoren:	Cytoperm 2, Heraeus Instruments, Hanau EB115EL+THERM, Jouan, Saint Herblain, F
konf. <u>L</u> aser <u>S</u> canning <u>M</u> ikroskop:	LSM 510, Zeiss, Oberkochen
Luminometer:	Lumat LB 9507, EG & G Berthold, Bad Wildbad
Magnetrührer:	MR 3002, Heidolph, Schwabach
Mikrotiterplattenphotometer:	Microplate Reader Model 550, Bio-Rad, München
PCR-Gerät:	Mastercycler (gradient), Eppendorf, Hamburg
Photometer:	Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Photoapparat:	DC280 Zoom, Kodak, Stuttgart
Pipetten:	Research oder Reference, Eppendorf, Hamburg
Schüttler:	GFL3012, GFL, Burgwedel REAX2000, Heidolph, Schwabach
Schüttelinkubatoren:	Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg Model G25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, New Brunswick, NJ, USA
Sicherheitswerkbank:	Typ VT196/85-KL II, RETEC, Menden
Spannungsgeräte:	PowerPac 300, Bio-Rad, München EPS 3500, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Szintillationsmeßgerät:	Wallac 1410, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ultraschallbad:	2210, Branson, Dietzenbach
Waagen:	AE 240, Mettler, Gießen 474, Kern, Albstadt
Wasserbad:	SW-20C, Julabo, Seelbach UC, Julabo, Seelbach
Zentrifugen	Biofuge 13, Heraeus Instruments, Hanau Minifuge RF, Heraeus Instruments, Hanau Varifuge 3.0R, Heraeus Instruments, Hanau Model J2-21, Beckman, Palo Alto, CA, USA Centrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg KR22, Jouan, Saint Herblain, F

5.1.3 verwendete Computerprogramme

Becton Dickinson CellQuest	(FACS-Analyse)
Endnote 3.1.3 ISI Research Soft	(Literaturverwaltung)
Generecord	(Programm zur Erstellung von Plasmidkarten)
Microsoft Word	(Textverarbeitung)
Microsoft Excel	(Tabellenkalkulation)
Adobe Photoshop	(Bildbearbeitung)
Macromedia Freehand	(Grafikdesign)
Zeiss LSM510	(Mikroskop-Steuerung)
Raytest Aida	(Bioimager-Auswertungssoftware)
Lasergene DNASTar	(Sequenzanalyse)

5.2 Lösungen

NP-40-Puffer:	50 mM	Tris-HCl
	500 mM	NaCl
	1 % (v/v)	NP-40
	3 % (w/v)	BSA
	1x	Proteaseinhibitoren
	in	H ₂ O, pH 7,5
PBS: (engl.: phosphate buffered saline)	150 mM	NaCl
	50 mM	KH ₂ PO ₄
	5 mM	KCl
	in	H ₂ O, pH 7,5
PBS-T:	150 mM	NaCl
	50 mM	KH ₂ PO ₄
	5 mM	KCl
	0,1 % (v/v)	Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaureat)
	in	H ₂ O, pH 7,5
Proteaseinhibitoren 1000x:	a)	
	1 mg/ml	Aprotinin
	1 mg/ml	E64
	1 M	Na ₃ VO ₄
	1 M	Na ₂ MoO ₄
	in	H ₂ O
	b)	
	1 m/ml	Bestatin
	1 mg/ml	Pepstatin
	100 mg/ml	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
SDS-Laemmli-Probenpuffer 4x:	in	20 % DMSO/80 % Methanol (v/v)
	2 % (w/v)	SDS
	5 % (v/v)	β-Merkaptoethanol
	10 % (v/v)	Glyzerol
	62 mM	Tris
	0,00125 % (w/v)	Bromphenolblau
TE (Tris-EDTA-Puffer):	in	H ₂ O, pH 6,8
	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA
	in	H ₂ O, pH 7,5

WCE-Puffer:	50 mM	Hepes
	20 mM	NaF
	450 mM	NaCl
	0,2 mM	EDTA
	1 % (v/v)	Nonidet-P40
	25 % (v/v)	Glyzerol
	in	H ₂ O, pH 7,8

WCE-Puffer Sf9:	25 mM	Hepes
	500 mM	NaCl
	1 mM	β-Merkaptoethanol
	0,1 % (v/v)	Nonidet-P40
	in	H ₂ O, pH 7,9

5.3 Medien

5.3.1 Antibiotika

Ampicillin 1000x	80 mg/ml	Merck Eurolab, Darmstadt
Amphotericin 500x	250 µg/ml	Biochrom, Berlin
Chloramphenicol 1000x	10 mg/ml	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kanamycin 1000x	25 mg/ml	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin 100x	10.000 U/ml, 10 g/ml	Seromed, Berlin
Zeocin 4000x	100 mg/ml	Invitrogen, Groningen, NL

5.3.2 Medien für Bakterien

LB-Medium	10 g/l	NaCl
(<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani-Medium)	10 g/l	Casein-Hydrolysat
	5 g/l	Hefe-Extrakt
	in	H ₂ O, pH 7,2
LB-Agar	15 g/l	Bacto-Agar in LB-Medium

5.3.3 Medien für Hefen

Vollmedium YPD:	1 % (w/v)	Hefe-Extrakt
	2 % (w/v)	Pepton-Hydrolysat
	2 % (w/v)	D-(+)-Glucose
Vollmedium YPGR:	1 % (w/v)	Hefe-Extrakt
	2 % (w/v)	Pepton-Hydrolysat
	2 % (w/v)	D-(+)-Galactose
	1 % (w/v)	D-(+)-Raffinose
Selektivmedium:	0,17 % (w/v)	Hefe Stickstoff Base
	0,5 % (w/v)	Ammoniumsulfat
	2 % (w/v)	D-(+)-Glucose
	2 % (w/v)	D-(+)-Galactose
	1 % (w/v)	D-(+)-Raffinose
	1,2 µg/ml	L-Arginin-Cl
	30 µg/ml	L-Asparaginsäure
	30 µg/ml	L-Glutaminsäure
	2,4 µg/ml	L-Isoleucin
	7,5 µg/ml	L-Phenylalanin
	56,25 µg/ml	L-Serin
	30 µg/ml	L-Threonin
Aminosäuremix: (Endkonzentration)	90 µg/ml	L-Tyrosin
	22,5 µg/ml	L-Valin

selektive	21,6 µg/ml	L-Leucin
Aminosäuren	10,8 µg/ml	L-Lysin
bzw. Basen:	4,8 µg/ml	L-Histidin
(Endkonzentration)	9,6 µg/ml	L-Tryptophan
	50 µg/ml	Adenin
	24 µg/ml	Uracil
	1,2 µg/ml	L-Methionin

Agarplatten wurden mit den entsprechenden Medien und zusätzlichen 24 g/l Agar hergestellt. Medien und Zuckerlösungen wurden in ddH₂O angesetzt, separat autoklaviert und dann vereinigt. Ebenso wurden die Aminosäuren als Stammlösungen angesetzt und nach dem Autoklavieren der restlichen Bestandteile als steril filtrierte Lösungen zugegeben.

5.3.4 Medien für die Zellkultur

DMEM	Life Technologies, Karlsruhe
(Dulbecco's Modifiziertes Eagle's Medium)	mit Glutamin, 4,5 % Glucose, pH 7,0
Fötale Kälberserum	Life Technologies, Karlsruhe
TNMH	Grace's Insekten Medium Life Technologies, Karlsruhe
	+ 3,62 g/l Laktalbumin
	+ 3,62 g/l Hefe-Extrakt
	+ 0,5 mg/ml Gentamycin Life Technologies, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
	0,5 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS ohne Mg ²⁺ /Ca ²⁺

5.4 Organismen

5.4.1 Bakterienstämme

Es wurden die folgenden *Escherichia coli* K12-Stämme eingesetzt:

BL21-codon plus TM -RP	F', <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>), <i>dcm</i> ⁺ , <i>Tet</i> ^r , <i>gal</i> , <i>endA</i> , <i>Hte</i> [<i>argU</i> , <i>proL</i> , <i>Cam</i> ^r], (Stratagene, Amsterdam, NL)
DH5αF'	F', Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 (φ80d <i>lacZ</i> ΔM15), <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk</i> ⁻ , <i>mk</i> ⁺), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , (Nal ^r) (Hanahan, 1983)
GM2163	F', <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>fhuA31</i> , <i>lacY1</i> , <i>tsx-78</i> , <i>supE44</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22hisG4</i> , <i>rpsL136</i> , (Str ^r), <i>xylA5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>thi-1</i> , <i>dam-13::Tn9</i> , (Km ^R), <i>dcm-6</i> , <i>hsdR2</i> , <i>mcrA</i> , <i>mcrB1</i>

5.4.2 Hefestämme

Die folgenden *S. cerevisiae* Stämme wurden eingesetzt:

YPH499	<i>Mata</i> , <i>ura3-52</i> , <i>las2-801</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-Δ63</i> , <i>his3-Δ200leu2Δ1</i> , Stratagene (Amsterdam, NL)
ΔL1	<i>Mata</i> , <i>ade1</i> , <i>his2</i> , <i>leu2-3</i> , <i>ura3</i> , <i>cln1::TRP1</i> , <i>cln2</i> , <i>cln3</i> , <i>GAL1::Cln2</i> (Lew, et al., 1991), S. I. Reed, (Scripps-Research Institute, LaJolla, CA, USA)

5.4.3 Zelllinien

Die nachfolgend aufgeführten Zelllinien wurden verwendet:

HeLa	humane Zervixkarzinom Zelllinie (ATCC CCL 2)
NIH/3T3	murine Fibroblasten Zelllinie (ATCC CRL 1658)
Sf9	Schmetterlingszelllinie (<i>Spodoptera frugiperda</i>) (ATCC CRL-1711)

5.4.4 Ratten

Es wurden zur Gewinnung von primären Ratten Embryo Fibroblasten nur Tiere des Fischer-Inzuchtstammes (Fischer F-344) verwendet, die von Charles River Laboratories, Sulzfeld; Harlan Winkelmann, Borcheln oder aus eigener Nachzucht stammten.

5.5 Verwendete Antikörper

Anti-cdk2 M2	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-cyclin E (N-term)	Kaninchen	Biozol Diagnostica, Eching
Anti-cyclin E (C-19)	Kaninchen	Santa Cruz , Heidelberg
Anti-cyclin E (HE12)	Maus	Santa Cruz , Heidelberg
Anti-Flag Epitop (M2)	Maus	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Anti-GFP	Kaninchen	BD Clontech , Heidelberg
Anti-HA Epitop (5CA10HA)	Maus	IFZ, Essen
Anti-Ha-Ras	Kaninchen	Santa Cruz , Heidelberg
Anti-Kaninchen Rhodamin gekoppelt	Ziege	Dianova,Hamburg
Anti-Kaninchen Peroxidase gekoppelt	Esel	Dianova , Hamburg
Anti-Maus Peroxidase gekoppelt	Esel	Dianova , Hamburg
Anti-myc 9E10	Maus	Santa Cruz , Heidelberg
Anti-p21 ^{Cip1} (DCS-65)	Maus	Calbiochem, Schwalbach
Anti-p21 ^{Cip1}	Kaninchen	Santa Cruz , Heidelberg
Anti-p27 ^{Kip1} (DCS-72)	Maus	Calbiochem, Schwalbach
Anti-p27 ^{Kip1}	Kaninchen	Santa Cruz , Heidelberg
Anti-p57 ^{Kip2}	Kaninchen	Santa Cruz , Heidelberg
Anti-p107	Kaninchen	Santa Cruz , Heidelberg
Anti-p130	Kaninchen	Santa Cruz , Heidelberg
Anti-pRb	Maus	BD Pharmingen , Heidelberg
Anti-RGS His Epitop (XDC8C40)	Maus	IFZ, Essen

5.6 Verwendete Plasmide und cDNAs

Karten der aufgeführten Plasmide finden sich im Anhang (7.1).

pBluescript KS	Stratagene, Amstardam, NL
pBlueBacHisA	Invitrogen, Groningen, NL
pDSred1-N1	BD Clontech , Heidelberg
pDSred1-N3	eigene Klonierung
pEGFP-N3	BD Clontech , Heidelberg
pEBFP	BD Clontech , Heidelberg
pEBFP-N3	eigene Klonierung
pFLAG-N3	eigene Klonierung
pGex4T2	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pIRES-EGFP	Invitrogen, Groningen, NL
pLTRD21bp	siehe (Lovec, <i>et al.</i> , 1994; Mäkelä, <i>et al.</i> , 1992)
pLTR-MCS+	eigene Klonierung
pM	BD Clontech , Heidelberg
pM-MCSnew	eigene Klonierung
pSp64polyA	Promega, Mannheim
pVP16	BD Clontech , Heidelberg
pVP16-MCSnew	eigene Klonierung
pZeolacZ	Invitrogen, Groningen, NL
pRS416Met25	R. Müller, IMT Marburg

Die folgenden cDNAs bzw. Plasmide waren vorhanden bzw. wurden freundlicherweise von den angegebenen Personen zur Verfügung gestellt:

Cdk2-HA	M. Eilers, IMT, Marburg
Cdk4-HA	
Myc	
CyclinA	B. Amati, DNAX, Palo Alto, CA, USA
CyclinA (Ratte)	N. Sibinga, Alb. Einst. Coll. Med., New York, NY, USA
CyclinD1	
CyclinE	R. Müller, IMT, Marburg (Mumberg, 1995)
CyclinE 1-215	R. Müller, IMT, Marburg (Mumberg, 1995)
CyclinE1-250	R. Müller, IMT, Marburg (Mumberg, 1995)
CyclinE 1-300	R. Müller, IMT, Marburg (Mumberg, 1995)
CyclinE 1-350	R. Müller, IMT, Marburg (Mumberg, 1995)
CyclinE 1-365	R. Müller, IMT, Marburg (Mumberg, 1995)
CyclinE 50-395	R. Müller, IMT, Marburg (Mumberg, 1995)
CyclinE 100-395	R. Müller, IMT, Marburg (Mumberg, 1995)
CyclinE 129-395	R. Müller, IMT, Marburg (Mumberg, 1995)
CyclinE _t	R. Müller, IMT, Marburg (Mumberg, <i>et al.</i> , 1997)
CyclinE R130A	J. Roberts, FHCRC, Seattle, WA, USA (Clurman, <i>et al.</i> , 1996)
CyclinE T380A	J. Roberts, FHCRC, Seattle, WA, USA (Clurman, <i>et al.</i> , 1996)
Cullin1HA	J. Roberts, FHCRC, Seattle, WA, USA (Singer, <i>et al.</i> , 1999)
E1A	
Ha-Ras, pGEJ-6.6	K. Alitalo, Dep. of Virology, University of Helsinki, Finland, (ATCC #41028) (Parada, <i>et al.</i> , 1982; Tabin, <i>et al.</i> , 1982)
pM3VP16	T. Schmidt, Bayer Ag, Wuppertal
p130-Gal4-pcDNA3	J. Nevins, Duke Univ. Durham, NC, USA (Meloni, <i>et al.</i> , 1999)
p16 ^{Ink4a}	
p21 ^{Cip1}	
p27 ^{Kip1}	J. Massague, MSKCC, New York, NY, USA
p45 ^{Skp2}	W. Krek, Friedrich Miescher Institut, Basel, Schweiz
p57 ^{Kip2}	S. Elledge, Baylor Coll. of Medicine, Houston, TX, USA
SV40largeT	R. Müller, IMT, Marburg, (Schuermann, 1990)
Spektrin-GFP	L.W. Enquist, B. Banfield, Princeton, USA, CA, USA
US9-GFP	L.W. Enquist, B. Banfield, Princeton, USA, CA, USA
5xGal4-E1b-luc	L. Klein-Hitpaß, IFZ, Essen

5.7 Verwendete Oligodesoxynukleotide

Die benutzten Oligodesoxynukleotide wurden über die Firmen MWG-Biotech, Ebersberg oder Life Technologies, Karlsruhe bezogen. Die genauen Bezeichnungen und Sequenzen finden sich im Anhang (7.1).

5.8 Arbeiten mit DNA und RNA

5.8.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

(Dower, *et al.*, 1988; Hanahan, 1983)

Zur Herstellung chemisch transformationskompetenter Bakterien wurden 300 ml LB-Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer $\Delta E_{600} = 0,5$ (logarithmische Wachstumsphase) in einem temperierbaren Schüttelinkubator kultiviert. Nach 20 minütiger Abkühlung der Bakteriensuspension auf Eis wurden die Bakterien in 50 ml Polypropylenröhrchen bei 4 °C und 3000 rpm abzentrifugiert. Die Pellets wurden in je 25 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien erneut pelletiert und in insgesamt 12 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen. Nach weiterer Inkubation auf Eis für 2 h wurden 4 ml Glycerol zugegeben und die Bakteriensuspension in Aliquots bei -80 °C gelagert.

Um Bakterien elektrisch transformieren zu können müssen sie in einer möglichst salzfreien Lösung vorliegen. Daher wurde wie oben beschrieben eine in der logarithmischen Phase befindliche Kultur von Bakterien abgekühlt

und in zwei grossen Zentrifugenflaschen (Nalgene, Wiesbaden) in einem JA-10 Rotor (Beckman, Palo Alto, CA, USA) für 20 min bei 4 °C und 3000 rpm abzentrifugiert. Dann wurden die Pellets in 500 ml eiskaltem H₂O aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Nach Wiederholen des Waschvorgangs wurden das Bakterienpellet in 10 ml eiskaltem H₂O aufgenommen.

5.8.2 Transformation von Bakterien

(Dower, *et al.*, 1988; Hanahan, 1983)

Um rekombinante Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* -Zellen einzubringen wurden zwei verschiedene Arten der Transformation gewählt. Chemisch kompetente Bakterien (100 µl) wurden mit der zu transformierenden DNA gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Im Folgenden wurden die Bakterien einem Hitzeschock unterzogen, 90 sec bei 42 °C, und anschließend nochmals für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde der Transformationsansatz für 60 min bei 37 °C unter dauerndem Schütteln inkubiert um den Bakterien die Möglichkeit zu geben, das von dem jeweils transformierten Plasmid kodierte Resistenzgen zu exprimieren. Abschließend wurde die Bakteriensuspension bei 3000 rpm, RT, für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 50-100 µl LB-Medium resuspendiert. Diese Bakterienlösung wurde dann auf LB-Agar-Kulturschalen, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Alternativ wurden Bakterien durch einen gesteuerten elektrischen Impuls transformiert (elektroporiert). Dazu wurden 40-50 µl der elektrokompenten Bakteriensuspension mit 1 µl der zu transformierenden DNA gemischt, in eine Elektroporationsküvette mit einer Spaltbreite von 0,1 cm überführt und diese mit Hilfe des Genepulser II Elektroporationsgerätes (Bio-Rad, München) bei 200 W, 35 mF und 1800 V einem kurzen Strompuls unterzogen. Dabei werden die Zellwände der Bakterien soweit geschädigt, daß die zu transformierende DNA durch diese „Löcher“ in den Zellwänden eindringen kann. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in 1 ml LB-Medium aufgenommen und 1 h bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert, sowie anschließend auf LB-Agar-Kulturschalen ausgestrichen.

5.8.3 Kultivierung von Bakterienzellen

Generell wurden Bakterien als Flüssigkultur in sterilem LB-Medium mit den den Resistenzmarkern der transformierten Plasmide entsprechenden Antibiotika in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und ca. 200 rpm kultiviert (5.3.1 und 5.3.2). Zur Anlage von Dauerkulturen wurden 500 µl einer über Nacht dicht gewachsenen Flüssigkultur mit 500 µl sterilem 87% Glycerol gemischt und anschließend bei -80 °C gelagert. Um aus der Dauerkultur eine neue Flüssigkultur anzulegen wurde mit einer sterilen Pipettespitze ein wenig der gefrorenen Kultur abgekratzt, in frisches Medium mit Antibiotikum gegeben, und erneut bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Um Klone nach Transformation zu selektionieren wurden die Bakterien auf LB-Agar-Kulturschalen mit den notwendigen Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.8.4 Isolierung von Plasmid-DNA in kleinen Mengen (Mini-Präp)

(Birnboim und Doly, 1979)

Zur schnellen Isolierung von kleinen Mengen Plasmid-DNA wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl TE aufgenommen, anschließend mit 200 µl 0,2 M NaOH/1 % SDS lysiert und mit 150 µl 3 M Kaliumacetat/2 M Essigsäure pH 4,8 neutralisiert. Daraufhin wurde der entstandene Zelldebris für 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun wurde die Lösung mit 750 µl Isopropanol gefällt und wiederum 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende DNA/RNA-Pellet mit 750 µl 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 40 µl TE-Puffer mit 10 µg/µl RNase A für einige Minuten bei 42 °C gelöst und gleichzeitig die kontaminierende RNA verdaut. Anschließend wurde die gewonnene DNA durch Restriktionsendonukleaseverdau und Agarosegelelektrophorese analysiert.

5.8.5 Isolierung von Plasmid-DNA in großen Mengen (Maxi-Präp)

(Birnboim und Doly, 1979)

Um grössere Mengen besonders reiner DNA für Subklonierungen (5.8.15), Sequenzierungen (5.8.16) oder Transfektionen (5.11.3) zu erhalten wurde das folgende, auf der alkalischen Lyse basierende Verfahren eingesetzt.

Eine über Nacht bei 37 °C in die stationäre Phase gewachsenen 300 ml LB-Kultur mit entsprechenden Antibiotika wurde für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml TE-Puffer resuspendiert und die Zellwände durch Zugabe von 20 ml 0,2 M NaOH/1 % SDS während einer 10 minütigen Inkubation auf Eis lysiert. Mit 15 ml eiskalter Kaliumacetat-Lösung (3 M Kaliumacetat/2 M Essigsäure pH 4,8) wurde das Lysat neutralisiert; nach weiteren 5 min auf Eis wurde der entstandene Zelldebris für 15 min bei 10000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde, um Kontamination mit Debris zu vermeiden, durch einen Filter in ein neues Röhrchen gegossen und durch Zugabe des 0,6-fachen Volumens an Isopropanol gefällt. Nach anschließender Zentrifugation für 15 min bei 10000 rpm und 4 °C wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 5 ml TE-Puffer gelöst. Nach Überführung in ein neues Röhrchen wurde der Lösung 2,5 ml 7,5 M Ammoniumacetat zum Ausfällen von Proteinverunreinigungen zugesetzt, 15 min auf Eis inkubiert und daraufhin erneut bei 10000 rpm, 4 °C für 15 min zentrifugiert. Dem in eine neues Zentrifugenröhrchen überführten Überstand wurde dann 750 ml RNaseA-Lösung (1 mg/ml) zugegeben um die RNA während der nächsten 15 min bei RT zu verdauen. Die mit TE-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 3 ml verdünnte DNA-Lösung wurde nun zweimal mit je 3 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, 25/24/1, (v/v/v) und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol, 24/1, (v/v) extrahiert und nach jeder Extraktion zur Phasentrennung für 10 min bei 10000 rpm und RT zentrifugiert. Die DNA-haltige, wässrige Phase wurde vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und erneut extrahiert bzw. nach der letzten Extraktion mit dem 0,1-fachen Volumen an 3 M Natriumacetat versetzt und mit 6 ml 100 % Ethanol gefällt. Die sedimentierte DNA wurde mit 3 ml 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und luftgetrocknet. Das trockene Pellet wurde in H₂O aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Alternativ wurden die kommerziellen Systeme Qiagen Maxi-DNA-Kit (Qiagen, Hilden oder Jetstar Maxi-Kit, Genomed, Bad Oeynhausen) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Beide Systeme beruhen ebenfalls auf der alkalischen Lyse der Bakterien und auf der Bindung von DNA an eine Silikamatrix.

5.8.6 Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen

Zur Isolation von „Gesamt“-RNA wurden die als Ausgangsmaterial dienenden Zellen in ein Rundbodenröhrchen aus Polypropylen (Becton Dickinson, Heidelberg) überführt, abzentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Für die eigentliche Isolation wurde der „RNeasy-Kit“ (Qiagen, Hilden) eingesetzt und weitestgehend nach den Angaben des Herstellers gearbeitet, wobei zur Vermeidung von RNase-Kontamination immer mit frischen Handschuhen, autoklavierten Pipettenspitzen, bei 180 °C sterilisierten Materialien, sowie DEPC-behandelten Lösungen gearbeitet wurde. Nach Aufnahme der Zellen in Lysispuffer wurden diese in den Rundbodenröhrchen mit Hilfe eines „Ultra-turrax“ (Janke & Kunkel, Staufen) homogenisiert und das entstandene Lysat auf die Säulchen des Kits aufgetragen. Nach den folgenden Zentrifugationsschritten mit Waschpuffer wurde abweichend von der Maßgabe des Herstellers mit 2 x 30 µl Elutionspuffer eluiert und die so erhaltenen RNA-Lösung dann photometrisch vermessen und die Konzentration auf 1 mg/ml eingestellt (5.8.7).

5.8.7 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA in wässriger Lösung

Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes einer wässrigen Lösung wurde die Absorption einer 1: 200 Verdünnung in einer 1ml Quarzküvette bei 260 nm ermittelt. Hierbei wurde folgende Gleichung zu Grunde gelegt $\Delta E_{260} = 1,00 = 50 \mu\text{g DNA/ml Lösung}$. Um die Reinheit der Lösung beurteilen zu können wurde der Quotient $\Delta E_{260}/\Delta E_{280}$ ermittelt, wobei Werte von 1,8 -2,0 als reine DNA-Lösungen, frei von kontaminierendem Protein angesehen wurden. Trotz grosser Reinheit, lieferten DNA-Lösungen, die mit kommerziellen Kits präpariert worden waren, immer niedrigere Quotienten (ca. 1,6-1,8). DNA-Lösungen wurden nach der Konzentrationsbestimmung auf 1 mg/ml eingestellt und durch Restriktionsendonukleaseverdau und anschliessender Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Für die Bestimmung der Konzentration von RNA wurde analog vorgegangen, jedoch wurde die Gleichung $\Delta E_{260} = 1,00 = 40 \mu\text{g RNA/ml Lösung}$ zu Grunde gelegt.

5.8.8 Restriktionsendonukleaseverdau von DNA

Zur sequenzspezifischen Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde entsprechend der Vorschriften der Hersteller vorgegangen. Im Allgemeinen wurde die Reaktion bei 37 °C, in einem vom Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt und ein mehrfacher Überschuss an Enzym eingesetzt. Zur qualitativen Analyse von „Mini-Präp“- DNA (siehe 5.8.2) wurden je 1 U des Enzyms in 15 µl Gesamtvolumen eingesetzt um 2,5 (= 0,5-1,0 µg DNA) der präparierten Lösung zu verdauen. Für den präparativen Verdau von DNA zum Einsatz in

anschließenden Ligationen (5.8.15) wurden 5-10 μg DNA in 150 μl Endvolumen mit 20-50 U des jeweiligen Enzyms inkubiert.

5.8.9 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Agarosegelelektrophorese diente zur qualitativen Abschätzung von DNA-Fragmentlängen nach Verdau mit Restriktionsenzymen, zur Kontrolle durch PCR amplifizierter DNA-Fragmente oder zur präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten, die für spätere Ligationen (5.8.15) benötigt wurden. Die mit der entsprechenden Menge an 10x DNA-Probenpuffer versetzten DNA-Fragment-Gemische wurden in 0,8-2,0 % Agarose-Gelen (inklusive 10 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid) in 1x TAE-Puffer für 0,5-1,5 h bei 80-120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel auf einem UV-Illuminationstisch per Videokamera aufgenommen. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und seine Lumineszenz unter UV-Licht kann daher die DNA-Fragmente sichtbar machen. Zu Dokumentationszwecken wurden Bilder der Videokamera mit Hilfe eines Thermodruckers ausgedruckt. Als Größen-Marker wurde die „1kb DNA ladder“ (Genecraft, Münster) verwendet.

TAE (Tris-Acetic Acid-EDTA-Puffer):

40 mM Tris
20 mM Essigsäure
1 mM EDTA
in H_2O , pH 7,8

DNA-Probenpuffer:

50 % (v/v) Glycerol
0,05 % Bromphenolblau
0,05 % Xylencyanol
in H_2O

5.8.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, wurde das entsprechende Fragment aus dem Gel unter UV-Illumination mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des Qiaquick-Kits (Qiagen, Ratingen), nach Vorgaben des Herstellers aufgereinigt. Hierbei wird, ähnlich der Anwendung bei den Plasmid-Isolations-Kits (5.8.5), die Bindung von DNA an eine Silikamatrix genutzt.

5.8.11 Konversion überhängender 5'- bzw. 3'-DNA-Enden

Durch Restriktionsendonukleaseverdau erhaltene, inkompatible 5'- bzw. 3'-Enden von DNA-Fragmenten wurden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (Konversion von 5'-Überhängen) oder T4-Polymerase (Auffüllen von 5'-Überhängen, Abbau von 3'-Überhängen) im Reaktionsansatz des Restriktionsendonuklease-verdaus aufgefüllt. Hierzu wurden dem präparativen DNA-Verdau 10 μl Lösung mit 5 μl dNTPs (je 2,5 mM), 1 μl Klenow/T4-Polymerase (= 1 U), 3 μl H_2O und 1 μl des entsprechenden Reaktionspuffers zugegeben und weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. In allen Fällen wurden „glatte“ DNA-Enden ohne Überhänge mit 5'-bzw. 3'-Phosphatrest gewonnen.

5.9.12 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten an den 5'-Enden

Um eine Religation des Vektors beim Klonieren von DNA-Fragmenten zu verhindern und damit den nicht rekombinanten Hintergrund beim Klonieren zu verringern, wurden die zur Religation notwendigen Phosphatreste an den 5'-Enden der Vektor-DNA abgespalten. Hierzu wurde dem Reaktionsansatz mit Restriktionsendonukleasen zum Ende der Inkubationszeit 0,5-1,0 U Phosphatase aus Kalbsdarm (calf intestinal phosphatase CIP) zugesetzt und weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde anschließend 10 μl 1 M EDTA zugegeben und 15 min bei 75 °C inkubiert. Die weitere Aufreinigung der dephosphorylierten Vektor-DNA erfolgte nach 5.8.9 und 5.8.10.

5.8.13 Hybridisierung und Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden

Zur Hybridisierung zweier chemisch hergestellter Oligodesoxynukleotide wurden jeweils 1 μg der beiden komplementären Oligodesoxynukleotide in einem Gesamtvolumen von 50 μl im Puffer der T4-Polynukleotid-Kinase 10 min bei 95 °C in einem Thermomixer erhitzt und dann langsam im ausgeschalteten Gerät bis auf RT abkühlen gelassen. Um die so hybridisierten Oligodesoxynukleotide in einen Endonuklease-geschnittenen und dephosphorylierten Vektor zu ligieren, wurden die Sequenzen so gewählt daß beim Hybridisieren überhängende Enden komplementär zu den benutzten Schnittstellen im Plasmidvektor entstanden. Außerdem musste das kurze

Oligodesoxynukleotiddimer zunächst phosphoryliert werden, was mit Hilfe der T4-Polynukleotid-Kinase bewerkstelligt wurde, die das γ -Phosphat von ATP auf das 5'-Hydroxylende von einzel- oder doppelsträngigen Polynukleotiden überträgt. In einem Gesamtvolumen von 60 μ l wurde 1 μ g hybridisierte Oligonukleotide im spezifischen Reaktionspuffer der Herstellerfirma des Enzyms mit 1 μ l T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/ μ l) für 1 h bei 37 °C inkubiert und die Reaktion abschließend durch eine 10 minütige Inkubation bei 65 °C abgestoppt. Die so hybridisierten und kinasierten Oligonukleotide wurden dann wie unter 5.8.15 beschrieben in einen Plasmidvektor ligiert.

5.8.14 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation und Modifikation von cDNAs

(Saiki, *et al.*, 1988; Sambrook, *et al.*, 1989)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR: engl. polymerase chain reaction) können selektiv genau definierte Nukleinsäurebereiche vervielfältigt werden. Bei diesem Verfahren kommen thermoresistente DNA-Polymerasen zum Einsatz, die von einem Oligodesoxynukleotid ausgehend einen DNA-Einzelstrang zum Doppelstrang vervollständigen. Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt wird durch zwei flankierende, sequenzspezifische Oligodesoxynukleotide, sog. Primer, festgelegt und beginnend am 3'-Ende des Primers am jeweiligen Einzelstrang komplementär unter Einbau von Desoxynukleotiden neu synthetisiert. Ein PCR-Zyklus besteht aus aufeinanderfolgenden Reaktionen, die durch die Temperatur beeinflusst werden: Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge bei 95 °C; Anlagerung der Oligodesoxynukleotide an die komplementären Einzelstränge bei 50-60 °C; DNA-Synthese bei 72 °C. Durch mehrfache Wiederholung dieser Zyklen kommt es zu einer exponentiellen Zunahme der gewünschten DNA-Sequenz.

Um zu klonierende cDNAs mit einer neuen Schnittstelle am 5'- oder 3'-Ende bzw. einer Kozak-Konsensus-Sequenz zu versehen oder das Stopcodon am 3'-Ende zu deletieren wurde die PCR verwendet. Hierbei wurden Oligodesoxynukleotide als Primer chemisch synthetisiert (durch die Firmen MWG Biotech, Ebersberg, oder Life Technologies, Karlsruhe), deren Sequenz die gewünschte Modifikation beinhaltet. Zumeist wurden die Primer so gewählt, daß am 5'-Ende der cDNA eine Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenz, von einer Kozak-Konsensus-Sequenz und der normalen Sequenz der cDNA beginnend mit dem ATG gefolgt, synthetisiert wurde (Bsp. AT GGA TCC ACC ATG...). Analog wurde das Oligonukleotid für das 3'-Ende der cDNA so gewählt, daß direkt nach dem terminierenden Stopcodon TAG eine Konsensus-Sequenz für eine Restriktionsendonuklease folgte oder um die cDNA an ein sogenanntes Markermolekül (engl. tag, z.B. grün fluoreszierendes Protein (GFP) oder FLAG-Epitop) zu fusionieren wurde das Stopcodon weggelassen um so eine mutierte cDNA zu erhalten, deren Leserahmen in die anzuhängende für das tag kodierende DNA-Sequenz weitergeführt wird. Für die PCR wurden 0,5 μ g eines Plasmids mit der zu amplifizierenden cDNA in einem Gesamtvolumen von 50 μ l 1x Puffer und 2 U einer sog. „proofreading“-Polymerase (hier Vent-Polymerase, Life Technologies, Karlsruhe) mit 0,25 mM dNTPs und 2 pM der jeweiligen Oligonukleotide in einem Thermocycler nach folgendem Programm inkubiert.

Reaktionsansatz:

Plasmid-DNA	0,5 μ g
dNTPs	5,0 μ l
Oligodesoxynukleotide	2,0 μ l
10 x Puffer	5,0 μ l
Polymerase	1,0 μ l
H ₂ O	ad 50 μ l
	45 sec

Programm des Thermocyclers:

	<u>1 min</u>	<u>95 °C</u>
5 Zyklen	45 sec	51 °C
	45 sec	72 °C
	45 sec	95 °C
5 Zyklen	45 sec	54 °C
	45 sec	72 °C
	45sec	95 °C
5 Zyklen	45 sec	57 °C
	72 °C	
	<u>45 sec</u>	<u>95 °C</u>
5 Zyklen	45 sec	60 °C
	45 sec	72 °C
	<u>45 sec</u>	<u>95 °C</u>
	1 h	4 °C

5.8.15 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA Fragmenten wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase durchgeführt. Die eingesetzten DNA-Mengen wurden so gewählt, daß das Verhältnis Vektor zu Insert 1/3 oder weniger betrug. Die Reaktion erfolgte in 20 μ l Volumen mit dem entsprechenden Puffer und 1 U T4-DNA-Ligase für 1-3 h bei RT. 10 μ l des Reaktionsvolumens wurden anschliessend in *E. coli* transformiert (5.8.2), diese ausgetrichen und die auf Selektionsplatten wachsenden Kolonien auf Vorhandensein des richtigen rekombinanten Plasmids überprüft (5.8.4, 5.8.8, 5.8.9).

5.8.16 Sequenzierung von DNA

Zur Analyse der genauen DNA-Sequenz wurde das Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977) angewandt und der Sequenase-Kit 2.0 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach Vorgaben des Herstellers eingesetzt. Die Sequenzierproben wurden gelelektrophoretisch in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt (6 % Polyacrylamid/7 M Harnstoff), wobei eine Modell-S2-Gelapparatur (Life Technologies, Karlsruhe) verwendet wurde. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Leistung von 65 W für 2-5 h unter Verwendung von 1x bzw. 3x TBE durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mit oder ohne vorherige Inkubation in 15 % Essigsäure auf ein Whatman-3MM-Papier aufgebracht, mit handelsüblicher Frischhaltefolie überzogen und in einem Gelrockner getrocknet. Die nachfolgende Autoradiographie erfolgte auf Röntgenfilmen.

Alternativ wurden die zu sequenzierenden Plasmide von gewerblichen Labors analysiert (MWG-Biotech AG, Ebersberg; Toplab, München) oder vom Sequenzierservice des Universitätsklinikums Essen. Diese Dienstleister arbeiten ebenfalls nach dem Kettenabbruchverfahren, setzen jedoch statt eines radioaktiv markierten Nukleotids vier mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Nukleotide ein. Zur Analyse werden Automaten eingesetzt die mit Hilfe eines Lasers die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente in einem Reaktionsmix der über ein Gel aufgetrennt worden ist erkennen und aus deren Abfolge ein Laufprofil und die Sequenz erstellen.

Acrylamidstammlösung:

38 % (w/v) Acrylamid
2 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid
in H₂O

TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer):

90 mM Tris
9 mM Borsäure
1 mM EDTA
in H₂O, pH 8,3

5.8.17 Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Sonden

Um DNA-Fragmente radioaktiv für den Einsatz als Sonden zur Detektion von spezifischen RNAs auf Nylonmembranen zu markieren, wurde der Megaprime Labeling Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. Dabei wird die eingesetzte DNA durch „random priming“ unter Einbau von α -³²P-dCTP mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I radioaktiv markiert. Es wurde entsprechend den Angaben des Herstellers 50 ng des zu markierenden Fragmentes zusammen mit „random Primer“ denaturiert, nach Abkühlen mit Reaktionspuffer versehen, sowie 50 μ Ci α -³²P-dCTP und 5 U Klenow-Fragment zugesetzt und für 30 min inkubiert. Anschließend wurden nicht eingebaute freie Nukleotide und Reste der Oligodesoxynukleotid-Primer mit Hilfe des Nucleotide Removal Kits (Qiagen, Hilden) entfernt. Zur Kontrolle der Markierungsreaktion wurde ein Aliquot der von den Säulen des Kits eluierten Lösung durch Cerenkov-Zählung in einem Scintillations-Zähler (Pharmacia Amersham Biotech, Freiburg) überprüft und in der Regel eine spezifische Aktivität von 2×10^5 bis 2×10^6 cpm/ μ l ermittelt. Vor Einsatz der radioaktiv markierten DNA-Sonden wurden diese für 5 min bei 95 °C denaturiert.

5.8.18 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

Zur Auftrennung von RNA wurden denaturierende Formaldehyd-Agarosegele verwendet. Hierzu wurden 1,5 g Agarose in 120 ml DEPC-behandeltem H₂O aufgekocht und nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurden 26 ml 37 %ige Formaldehydlösung, sowie 3 ml 50x MOPS-Puffer zugegeben und die ganze Lösung in einen waagerechten Gelhalter gegossen. Von der aufzutrennenden RNA wurden 8 μ g mit dem gleichen Volumen an Denaturierungspuffer versehen und für 15 min bei 56 °C inkubiert. Nach Zugabe der entsprechenden Menge mit DEPC-behandeltem H₂O angesetzten 10x DNA-Probenpuffer wurden die Proben in die Taschen des Gels pipettiert und in 1x MOPS als Laufpuffer für ca. 10 h bei konstant 60 V aufgetrennt.

Denaturierungspuffer (Northern Blot):

1,65 x	MOPS-Puffer
19 % (v/v)	Formamid
20 % (v/v)	Formaldehyd
20 µg/ml	Ethidiumbromid
in	H ₂ O

MOPS-Puffer 50x:

1 M	MOPS
250 mM	Natriumacetat
5 mM	EDTA
in	H ₂ O

RNA-Probenpuffer:

30 % (v/v)	Glyzerol
0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
0,05 % (w/v)	Xylencyanol
in	H ₂ O (DEPC-behandelt)

5.8.19 Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern Blot)

Um die elektrophoretisch aufgetrennte RNA (5.8.18) auf eine Nylonmembran zu transferieren wurde die Methode des sogenannten „Kapillar-Blot“ eingesetzt. Zunächst jedoch wurde das Formaldehydgel in 20x SSC äquilibriert. Nun wurde ein ca. 10-15cm hoher Stapel Papierhandtücher zwischen zwei Wannen mit 20x SSC als Transferlösung gelegt und darauf zwei in 20x SSC getränkte passend zugeschnittene Stücke Whatman-3MM-Papier auf die dann die ebenfalls in 20x SSC äquilibrierte Nylonmembran (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gelegt wurde. Auf letzterer wurde unter Vermeidung von Luftblasen das äquilibrierte Agarosegel gelegt, gefolgt von zwei weiteren Whatmann-3MM-Papieren und zwei langen Streifen Whatman-3MM-Papier, die als Brücken die beiden als Transferpufferreservoir dienenden Wannen mit dem eigentlichen Blot verbanden und somit einen ständigen Nachschub von Puffer gewährleisteten. Als oberer Abschluß diente eine Glasplatte, die mit einem Gewicht zusätzlich beschwert wurde. Durch die Schwerkraft und die Kapillarwirkung der unten liegenden Papierhandtücher wurde nun die Flüssigkeit inklusive der aufgetrennten RNA-Proben aus der Agarosematrix gezogen, wobei die RNA auf der Nylonmembran immobilisiert wurde. Nach einer Transferdauer von ca. 24 h wurde die Nylonmembran kurz in frischem 20x SSC gewaschen und die transferierte RNA danach mit Hilfe von UV-Licht in einem UV-Stratalinker 2400 (Stratagene, Amsterdam, NL) mit 120 mJ/cm² für 30 sec mit der Membran kreuzvernetzt.

5.8.20 Hybridisierung und Autoradiographie von geladenen Nylonmembranen

Um spezifisch bestimmte mRNAs innerhalb einer Gesamt-RNA Population nachzuweisen, wurde die elektrophoretisch aufgetrennte RNA (5.8.18) auf Nylonmembranen transferiert (5.8.19) und diese dann mit einer genspezifischen, radioaktiv markierten DNA-Sonde (5.8.17) hybridisiert und anschließend autoradiographisch analysiert. Hierzu wurde die Nylonmembran zunächst mit Hybridisierungslösung in Glas-Hybridisierungsröhren (Biometra, Göttingen) überführt, bei 60 °C in einem Hybridisierungssofen (Biometra, Göttingen) für 2 h äquilibriert und dabei freie Stellen auf der Membran durch die im Puffer vorhandene Lachs-Sperma-DNA abgesättigt. Anschließend wurde die [³²P]-markierte DNA-Sonde zugegeben und ü. N. bei 60 °C inkubiert. Im Folgenden wurde die Membran mehrfach mit 2X SSC/0,1 % SDS (w/v) gewaschen, zwischendurch mit einem Zählrohr überprüft, bis die Hintergrundaktivität entfernt war. Danach wurde die Membran auf eine Bioimagerplatte exponiert, diese im Fuji Bioimager1500 (Raytest, Straubenhardt), sowie mit den entsprechenden Auswertungsprogrammen (Raytest, Straubenhardt) analysiert und im Folgenden ein Röntgenfilm unter Lichtausschluß aufgelegt und später mit einer automatischen Entwicklermaschine Curix 60 (Agfa Gevaert, Morsel, B) entwickelt.

Hybridisierungslösung (Northern Blot):

7 % (w/v)	SDS
1 % (w/v)	BSA
15 % (v/v)	Formamid
200 mM	Na ₂ HPO ₄ /NAH ₂ PO ₄
2 mM	EDTA
0,1 mg/ml	Heringssperma DNA
in	DEPC behandeltem H ₂ O, pH 7,2

SSC 20x:

3 M	NaCl
0,3 M	Natriumcitrat
in	H ₂ O, pH 7,0

5.9 Arbeiten mit Proteinen

5.9.1 Gesamtproteinextraktion aus *E. coli*

Um Bakterienklone auf das Vorhandensein eines rekombinant zu exprimierenden Proteins zu überprüfen, mußte zunächst ein Gesamtproteinextrakt hergestellt werden. Dazu wurde eine 3 ml Flüssigkultur mit einer Bakterienkolonie des zu untersuchenden Klones angeimpft und ü. N. bei 37 °C in einem temperierbaren Schüttlerinkubator wachsen gelassen. Zur Induktion der Transkription des unter einem regulierten Promotor stehenden, zu exprimierenden Genes wurde dann IPTG (1 mM Endkonzentration) zugegeben und das Volumen der Kultur verdoppelt. Nach erneuter Inkubation für 2 h wurde ein Aliquot von 1,5 ml abzentrifugiert, das Pellet mit PBS gewaschen und abschließend in 100-200 µl 4x SDS-Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Nach Aufkochen der Probe bei 95 °C für 2 min und zentrifugeller Sedimentation der festen Bestandteile wurde ein Aliquot des Überstandes mittels SDS-PAGE und folgender Coomassie-Färbung (5.9.9) oder Immun-Blot (5.9.10) analysiert.

Um im größeren Maßstab Proteinextrakte aus *E. coli* für die spätere Aufreinigung von rekombinant exprimierten Proteinen (5.9.8) zu gewinnen wurden 250 ml Selektions-LB-Medium mit den entsprechenden Bakterien inokuliert und ü. N. bei 37 °C unter dauerndem Schütteln kultiviert. Nachdem die Kultur dicht gewachsen war wurde das Volumen verdoppelt, IPTG zugegeben und erneut für 2 h inkubiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert, das Pellet mit PBS gewaschen und anschließend in 20-40 ml WCE-Puffer inkl. Proteaseinhibitoren resuspendiert. Die auf Eis abgekühlte Bakterienlösung wurde dann 3 mal für 15 sek mit Hilfe eines Ultraschallstabes beschallt und anschließend für 30 min bei 37 °C mit 50 U Benzonase® (Roche Diagnostics, Mannheim) zum Verdau von DNA und RNA inkubiert. Nach einer abschließenden Zentrifugation zur Pelletierung der unlöslichen Bestandteile erhielt man einen Gesamtproteinextrakt der dann auf Expression des gewünschten Proteins mittels SDS-PAGE (5.9.9) und Immun-Blot (5.9.10) analysiert werden konnte bzw. zur weiteren Proteinaufreinigung nach 5.9.8 diente.

5.9.2 Gesamtproteinextraktion aus *S. cerevisiae*

Zur Untersuchung der korrekten Expression eingebrachter Plasmide in Hefen mußte aus denselben ein Gesamtproteinextrakt gewonnen werden. Hierzu wurde eine 5 ml Flüssigkultur angeimpft, bei 30 °C und dauernder Bewegung inkubiert und nach Erreichen einer $\Delta E_{600} > 0,6$ pelletiert und zweimal mit H₂O gewaschen. Um den regulierbaren Met-Promotor anzuschalten wurden die Hefen danach erneut für 6 h in der Abwesenheit von Methionin inkubiert und nachfolgend nochmals pelletiert und gewaschen. Das Pellet wurde dann in 4x SDS-Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach Abzentrifugieren der festen Bestandteile wurde ein Aliquot des Überstandes durch SDS-PAGE und anschließendem Immun-Blot analysiert (5.9.9 & 5.9.10).

5.9.3 Gesamtproteinextraktion aus eukaryontischen Zellen

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten aus eukaryontischen Zellkulturen wurden die adhären auf Plastikzellkulturschalen wachsenden Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit PBS abgespült oder mit einem Gummischaber von der Kulturschale abgelöst. Die Zellsuspension wurde 5 min lang bei niedriger Umdrehungszahl zentrifugiert und das Zellpellet gegebenenfalls nochmals mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde dann in WCE-Puffer inkl. Proteaseinhibitoren resuspendiert und die Zellen durch 3 Einfrier-Auftauzyklen lysiert. Durch Zentrifugation wurden die unlöslichen, hochmolekularen Bestandteile abgetrennt und der Überstand als Gesamtproteinextrakt gewonnen und konnte dann für weitere Analysen (5.9.4, 5.9.9, 5.9.10, 5.9.12 und 5.9.13) verwendet werden.

5.9.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen in wässriger Lösung

(Bradford, 1976)

Bei der Bestimmung der Proteinkonzentration in wässrigen Lösungen macht man sich die Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs „Coomassie brilliant blue G250“ nach Bindung an Proteine von 465 nm nach 595 nm und den dadurch bedingten Farbwechsel zu Nutze. Ein Aliquot der zu bestimmenden Probe wurde in H₂O auf ein Gesamtvolumen von 800 µl verdünnt, diesem 200 µl des Bradford-Farbreagens zugegeben und gut gemischt. Anschließend wurde die Extinktion der Probe bei 595 nm (ΔE_{595}) photometrisch gegen einen Leerwert bestimmt. Die Konzentration konnte durch Messung von Standardwerten mit BSA sowie folgender Erstellung und Analyse der Standardkurve mit Hilfe des Computerprogramms Excel und einer linearen Regressionsanalyse errechnet werden.

Bradford-Farbreagenz:	(alternativ Bradford-Reagenz der Firma Bio-Rad, München)
100 mg	Serva Blue G250
50 ml	Ethanol
100 ml	Phosphorsäure
ad 1 l	H ₂ O

5.9.5 *in vitro* Translation von Proteinen

Um rekombinante Proteine in kleinen Mengen *in vitro* zu synthetisieren wurde das „TNT®-Coupled Transcription/Translation System“ (Promega, Mannheim) eingesetzt. Dabei wurde von einem Plasmid mit Hilfe einer synthetischen Promotors für T3-, T7- oder Sp6-RNA-Polymerase die dahinter klonierte cDNA transkribiert und in einer gekoppelten Reaktion diese mRNA direkt in ein Protein translatiert. Hierzu wurde ein Lysat aus Kaninchen-Retikulozyten zur Bereitstellung der Translationsmaschinerie eingesetzt, dem ein selektiver Aminosäuremix zugegeben wird. Diesen Translationsvorgang mit vorgegebener Aminosäurequelle nutzt man zum Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren (³⁵S-Methionin, -Cystein oder ¹⁴C-Leucin) um die geringen Mengen des so synthetisch hergestellten Proteins gut durch Autoradiographie detektieren zu können. Weitestgehend wurde nach den Vorgaben des Herstellers verfahren und ausschließlich ³⁵S-Methionin als markierende radioaktive Aminosäure verwendet. Zum Einsatz kam das Sp6-gekoppelte System mit dem Vektor pSP64polyA (Promega, Mannheim). Es wurden 3-5 µg des zu translatierenden Plasmids in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 20-40 µCi ³⁵S-Methionin bei 30 °C für 90 min inkubiert und anschließend ein 2 µl-Aliquot gelelektrophoretisch durch SDS-PAGE (5.9.9) und folgende Autoradiographie oder mit Hilfe eines Bioimagers analysiert.

5.9.6 Rekombinante Proteinexpression in *E. coli*

Zur rekombinanten Expression von Proteinen in Bakterien wurden zwei verschiedene Systeme benutzt; zum einen das Glutathion-S-Transferase (GST) -Fusions-System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und zum anderen das „His-Tag“-System (Qiagen, Hilden). Beide Systeme nutzen die Expression eines rekombinanten Proteins mit einem sogenannten „tag“ das die Aufreinigung des gewünschten Eiweiß ermöglicht. Bei dem ersten Verfahren wird das Protein des Interesses an ein zweites fusioniert, hier die Glutathion-S-Transferase, und damit dem so entstehenden chimären Protein die Eigenschaft der GST an sein Substrat das Glutathion zu binden verliehen. Dies macht man sich zu Nutze indem man die chimären Proteine über eine Affinitätsmatrix mit kovalent gebundenem Glutathion aufreinholt und mit einem Überschuss an freiem Glutathion wieder eluiert. Das zweite System verwendet die Fusion eines kleinen Peptids bestehend aus 6 Histidinen an den N-Terminus des gewünschten Proteins. Dieses Hexa-Histidin-Peptid besitzt die Eigenschaft an Ni²⁺- oder Co²⁺-Ionen als Chelat zu binden. Diese Bindung bildet wiederum die Grundlage für die Aufreinigung über eine Affinitätsmatrix mit an die Agarose gekoppelten Ni²⁺- oder Co²⁺-Ionen. Die gebundenen Proteine können durch Konkurrenz mit Imidazol wieder von der Matrix abgelöst werden. Hierzu wurden die cDNAs der zu exprimierenden Proteine im korrekten Leserahmen in die entsprechenden bakteriellen Expressionsplasmide (pGEX4T2 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bzw. pQE30 (Qiagen, Hilden) kloniert und diese gegebenenfalls sequenziert. Um die gewünschten Proteine in *E. coli* zu exprimieren wurde in der Regel wie unter 5.9.1 verfahren. Das heißt die Repression der Expression des rekombinanten Proteins durch den *lac* Repressor wurde durch Zugabe von IPTG aufgehoben und dadurch die gewünschte chimäre cDNA transkribiert und translatiert. Das so entstehende rekombinante Protein wurde dann nach 5.9.1 und 5.9.8 aufgereinigt und nach 5.9.9 und 5.9.10 analysiert und sofern die Präparation rein genug war für weitere Experimente (5.9.11-13) eingesetzt.

5.9.7 Rekombinante Proteinexpression in Sf9-Zellen durch Baculoviren

Da sich zwar die meisten Proteine rekombinant in Prokaryonten herstellen lassen, diese jedoch nicht alle notwendigen posttranslationalen Modifikationen einer eukaryontischen Zelle ausführen können, sind Expressionssysteme in Eukaryonten-Systemen vonnöten. Hier kam das sogenannte „Baculovirus-System“ zum Einsatz, dabei nutzt man die Möglichkeit Baculoviren (hier *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*, AcNPV) genetisch so modifizieren zu können, daß ein gewünschtes Protein kodiert und dieses dann in den mit den rekombinanten Viren infizierten Zellen produziert wird. In den Vektor pBlueBacHisA (Invitrogen, Groningen, NL) wurden die gewünschten cDNAs kloniert, so daß ein chimäres Protein mit einem N-terminalen „RGS-6xHis-tag“ kodiert wird. Das so erhaltene Plasmid wurde zusammen mit Virus-DNA (AcNPV „Baculogold-DNA“, BD

Pharmingen, Heidelberg) mittels Lipofektion in Sf9-Zellen (aus *Spodoptera frugiperda*) transfiziert. Diese kommerziell erhältliche Virus-DNA linearisiert und enthält eine lethale Deletion, daher sollten ohne Rekombination mit einem geeigneten Vektor, der diese Deletion rekonstituiert, keine funktionellen Viruspartikel entstehen.

5.9.7.1 Transfektion von Sf9-Zellen

In Sf9-Zellen wurde DNA mit Hilfe kationischer Lipide eingebracht. Zur Transfektion wurden in 100 μ l TNMH-Medium ohne FCS 2,5 μ l der Virus DNA mit 2,5 μ g des rekombinanten Plasmids gemischt und in weiteren 100 μ l Medium 6 μ l Lipofektamin® (Life Technologies, Karlsruhe). Beide Ansätze wurden vereinigt, gut gemischt und nach 15 min Inkubation bei RT zu einer Kultur von 2×10^6 Sf9-Zellen in einer 25 ml Zellkulturflasche mit 2 ml TNMH ohne FCS gegeben. Das Medium wurde nach 12 h Inkubation bei 27 °C gegen TNMH-Medium mit FCS und 150 μ g/ml X-gal ausgetauscht. Nach einigen Tagen färbte sich das Medium blau, da das zugegebene X-Gal von der in den transfizierten Zellen produzierten β -Galaktosidase zu einem blauen Indol-Farbstoff umgesetzt wurde. Dies diente sowohl als Kontrolle für die erfolgreiche Transfektion, als auch für die korrekte Produktion von Viren in den transfizierten Zellen, da nur nach Rekombination des BlueBac-Plasmids in die Virus-DNA das β -Galaktosidase-Enzym kodiert und produziert werden kann. Nun wurde das überstehende Medium abgesaugt und mit serumfreiem TNMH verdünnt.

5.9.7.2 Isolierung rekombinanter Baculoviren

Um einzelne Viren aus dem Überstand der Transfektion (5.9.7.1) isolieren zu können wurde ein sogenannter „Plaque-Assay“ durchgeführt. Dazu wurden je 2,5 ml einer 10^{-3} -, 10^{-4} -, 10^{-5} -, 10^{-6} -Verdünnung des Überstandes zu 4×10^6 Sf9-Zellen auf einer 10 cm Ø Kulturschale gegeben um diese zu infizieren und für 2 h auf einer Wippe bei RT bewegt. Währenddessen wurde eine zuvor autoklavierte 2,5 %ige Agaroselösung (niedrigschmelzende Agarose (Baculovirus Agarose, Invitrogen, Groningen, NL) in PBS) aufgeschmolzen, je 2,5 ml in ein steriles 15 ml Plastikröhrchen überführt, bei 48 °C im Wasserbad inkubiert und mit 2,5 ml vorgewärmten TNMH-Medium mit FCS gemischt. Außerdem wurde TNMH-Medium mit FCS und 150 μ g X-Gal/ml vorbereitet. Nun wurde die Infektionslösung von den Zellkulturplatten abgenommen, 5 ml des TNMH-X-Gal-Mediums zu je 5 ml warmer Agaroselösung gegeben und dieses Gemisch sofort vorsichtig über den Zellmonolayer auf der Zellkulturplatte pipettiert. Nach Erhärten der Agarose wurden die Platten, um Austrocknung zu verhindern zusammen mit einem feuchten Tuch, in Folie verpackt und bei 27 °C inkubiert. Nach 5 Tagen konnten makroskopisch sichtbare, blaufärbte Bereiche (Plaques) detektiert werden, die bei mikroskopischer Betrachtung Sf9-Zellen beinhalteten die aufgrund ihrer Morphologie als infiziert eingestuft werden konnten, denn sie wiesen eine erhöhte Granularität des Zytoplasmas und insgesamt vergrößertes Zellvolumen auf. Mit sterilen Pasteurpipetten konnten kleine Agarozylinder aus den blaufärbten Bereichen gestanzt werden und diese in TNMH-Medium ohne FCS überführt werden. Mit dieser Lösung wurden dann erneut Sf9-Zellen auf einer 6 cm Ø Kulturschale infiziert und nach 5 Tagen das Überstehende Medium als Primär-Virus-Lösung abgesaugt. Die verbliebenen Zellen wurden mit PBS abgespült, pelletiert und ein Extrakt hergestellt (5.9.3), der auf Expression des gewünschten Proteins mittels SDS-PAGE (5.9.9) und Immun-Blot (5.9.10) überprüft wurde. Auf diese Art wurden pro gesuchtem Virus aus dem ersten „Plaque-Assay“ 6-10 verschiedene Virusplaques auf die Kodierung für das rekombinante Protein überprüft.

5.9.7.3 Anlegen einer Virus-Stammlösung

Aus zwei positiv exprimierenden Viren wurden dann hochkonzentrierte Virus-Stammlösungen hergestellt indem 5 10 cm Ø Kulturschalen mit Sf9-Zellen mit der Primär-Virus-Lösung infiziert und für 5 Tage kultiviert wurden. Das Medium wurde abgesaugt und als Stammlösung bei 4 °C aufbewahrt. Die Menge der enthaltenen Viren wurde mit Verdünnungsreihen in einem „Plaque-Assay“ bestimmt und Konzentrationen von 1×10^7 - 1×10^9 Viren/ml Medium festgestellt.

5.9.7.4 Infektion von Sf9-Kulturen mit rekombinanten Baculoviren

Mit diesen Virus-Stammlösungen konnten Sf9-Zellen in Schüttelkultur infiziert werden, um rekombinante Proteine aus den infizierten Zellen zu gewinnen. Dabei wurden $1-5 \times 10^9$ Zellen mit einer Virusmenge entsprechend einer MOI (engl.: multiplicity of infection, Zahl der infektiösen Partikel pro Zelle) von 10 infiziert. Diese

wurden in 20-40 ml serumfreiem TNMH auf einem Roller bei RT für 1 h inkubiert und dann auf mehrere sterile Glas-Erlenmeyerkolben mit Vollmedium und 0,05 % Pluronic F-68 (Life Technologies, Karlsruhe), verteilt, so daß eine Zelldichte von 4×10^5 /ml entstand. Nach einer 3tägigen Kultivierung im Schüttelwasserbad wurden die Zellen pelletiert, gewaschen und nach 5.9.3 und 5.9.8 aufgearbeitet.

5.9.8 Isolierung und Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine

Die nach 5.9.1, 5.9.3 und 5.9.6 bzw. 5.9.7 erhaltenen Proteinlösungen wurden mit Glutathion-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) oder Nickel-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) bzw. Talon® Cobalt-Matrix (BD Clontech, Heidelberg) nach Zugabe von Glutathion oder Imidazol (Endkonzentration 1mM) unter dauernder Bewegung bei 4 °C für mindestens 2 h inkubiert. Danach wurde die Suspension in eine Tropfsäule gefüllt und der Durchlauf aufgefangen. Die so gefüllte Säule wurde dann mit 10 Volumina Waschpuffer gespült und anschließend die gebundenen Proteine mit dem gleichen Puffer plus 150 mM Glutathion bzw. Imidazol eluiert. Aliquots der so erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (5.9.9) oder Immun-Blot (5.9.10) auf ihren Proteingehalt überprüft, wobei auch der Durchlauf und die Waschfraktionen mitkontrolliert wurden um einen Aufreinigungsfaktor zu ermitteln oder den etwaigen, vorzeitigen Verlust des Proteins zu dokumentieren. Die Fraktionen, die das gewünschte Protein beinhaltenen wurden daraufhin vereinigt und entweder mehrmals gegen Waschpuffer ohne Glutathion bzw. Imidazol dialysiert (Slide-A-lyzer, Perbio, Bonn) oder in Ultrafree-Konzentrationsröhrchen (Millipore, Eschborn) durch wiederholtes Zentrifugieren konzentriert. Abschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt (5.9.4) und eine SDS-Gelelektrophorese (5.9.9) zur Kontrolle durchgeführt.

Waschpuffer:

25 mM	Hepes
100 mM	NaCl
10 % (v/v)	Glyzerol
0,05 % (v/v)	NP-40
1 mM	Glutathion oder Imidazol
1x	Proteaseinhibitoren
in	H ₂ O, pH 7,9

5.9.9 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteingemischen nach dem Molekulargewicht wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) eingesetzt. Dabei werden die, durch gebundenes SDS negativ geladenen, Proteine im angelegten elektrischen Feldes durch eine Gelmatrix zur Anode bewegt und dabei nach ihrem relativen Molekulargewicht aufgetrennt. Die Gele wurden zwischen abgedichtete Glasplatten gegossen und in den entsprechenden Elektrophoresekammern eingesetzt. Es wurden Gele bestehend aus einem 4 %igen Sammelgel (4% Acrylamid, 0,107 % Bisacrylamid in 125 mM Tris-HCl, 0,1 % SDS, pH 6,8) und einem 9-15 %igen Trenngel (9-15 % Acrylamid, 0,24-0,4 % Bisacrylamid in 375 mM Tris-HCl, 0,1 % SDS, pH 8,8) je nach Größe des zu analysierenden Proteins verwendet (Minigele: 2 cm Sammelgelstrecke, 6 cm Trenngelstrecke, 0,75 mm Geldicke; Midigele: 2-3 cm Sammelgelstrecke, 10 bzw. 18 cm Trenngelstrecke, 1 mm Geldicke). Vor dem Gießen der Gellösung zwischen die Glasplatten wurde zur Vernetzung pro 10 ml Gellösung 15 µl TEMED und 150 µl 10 %ige frische Ammoniumpersulfatlösung zugegeben um den Polymerisationsprozess zu starten. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 80-100 V bis die Lauffront mit dem Bromphenolblau das Trenngel erreicht hatte. Danach wurde die Spannung auf 150-250 V erhöht, bis der Farbmarker die Gelmatrix am Ende der Elektrophorese verlassen hatte. Als Molekulargewichts-Standard wurde SDS-PAGE Standard (broad-range 6-200 kDa, Bio-Rad, München) oder zur Kontrolle während der Elektrophorese ein vorgefärbter Standard (Prestained Protein Marker, Broad Range, 6-175 kDa, NEB, Frankfurt) verwendet. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die Gele entweder nach 5.9.10 weiterverwendet oder für 15 min in 10 % Eisessig/25 % Propanol/65 % H₂O (v/v/v) fixiert, nachfolgend bei Analyse von ¹³⁵S-markierten Proteinen für die Autoradiographie 30 min in Verstärkerlösung (1 M Natriumsalicylat) inkubiert, abschliessend getrocknet und zur Autoradiographie mit einem Röntgenfilm exponiert. Alternativ wurden die fixierten Gele für 120 min in Coomassielösung (Brilliant Blue G, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) oder 0,1 % (w/v) Serva Blue G250, 25 % (v/v) Methanol, 5 % (v/v) Essigsäure in H₂O gefärbt, die nicht proteinhaltigen Gelbereiche danach mit 10 % (v/v) Essigsäure 30 % (v/v) Ethanol in H₂O entfärbt, das Gel auf Whatman-Filterpapier aufgebracht und im Geltrockner bei 80 °C unter Vakuum getrocknet.

Acrylamidstammlösung:

30 % (w/v) Acrylamid
 0,8 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid
 in H₂O
 (Rotiphoress Gel 30, Roth)

SDS-Laufpuffer:

190 mM Glycin
 25 mM Tris-HCl
 1 % (w/v) SDS
 in H₂O

5.9.10 Transfer von Proteinen auf eine Nylonmembran (Immun-(Western-)Blot)

Um Proteine spezifisch in einem Proteingemisch identifizieren zu können wird dieses durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (5.9.9) und anschließend auf eine Membran übertragen. Auf dieser kann mit spezifischen Antikörpern gegen das gesuchte Protein, sowie durch Verstärkung mit enzymgekoppelten Zweitantikörpern gegen den 1. Antikörper und einer abschließenden Enzymreaktion das gesuchte Protein nachgewiesen werden. Zur Immobilisierung von Proteinen auf einer Nylonmembran wurde das sog. "semi-dry Verfahren" verwandt. Der Aufbau erfolgte nach Vorgabe des Herstellers: auf die Graphitanode wurden 6 Lagen Whatman-3MM-Papier in Anodenpuffer II, 3 Lagen Whatman-3MM-Papier in Anodenpuffer I, Nylonmembran (Hybond C+, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), das SDS-Gel sowie 9 Lagen Whatman-3MM-Papier in Kathodenpuffer unter Vermeidung von Luftblasen gestapelt. Es konnten mehrere dieser Stapel übereinander in der Kammer eingesetzt werden um zwei oder mehr Gele zeitgleich zu transferieren. Die Übertragung der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Nylonmembran geschah im elektrischen Feld bei 1,5 mA/cm² Gelfläche für 90 min. Danach wurde die Membran zur Kontrolle eines homogenen Transfers und zum Markieren der Standardbanden mit 0,2 % (w/v) Ponceau-S in 3 % (w/v) Trichloressigsäure gefärbt. Nach Entfärbung mit PBS wurde die Membran mit 5 % w/v Magermilchpulver in PBS-T abgesättigt. Die Membran wurde mit dem spezifischen 1. Antikörper (meist 1/1000 verdünnt) in 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS-T zur Detektion des gesuchten Proteins für mindestens 2 h unter ständiger Bewegung bei RT oder 4 °C inkubiert. Im Folgenden wurde die Membran 3x mit PBS-T gewaschen und mit dem entsprechenden Peroxidase gekoppelten 2. Antikörper (1/5000 verdünnter Antikörper (Dianova, Hamburg) in 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS-T für 1-2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde erneut 3x mit PBS-T sowie 2x mit PBS gewaschen und die Membran dann in einer Peroxidase-Substratlösung getränkt. Die Umsetzung des Substrats und die davon ausgehende Lichtemission konnten durch Exposition von Röntgenfilmen detektiert werden. Als Substrate dienten der ECL- Kit oder ECL-Plus-Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), das „Lumi-Light Plus Western Blotting Substrate“ (Roche Diagnostics, Mannheim) oder das folgende Substratgemisch:

Lösung A 2,5 mM Luminol in DMSO

Lösung B 90 mM Para-Coumarsäure in DMSO

Lösung C 1 M Tris-HCl in H₂O, pH 8,5

Für die gebrauchsfertige Substratlösung wurden 10 ml Lösung A, 4,45 ml Lösung B und 100 ml Lösung C zu 850 ml H₂O gegeben und auf 1l aufgefüllt. Zum Entwickeln eines Immun-Blots wurden 10 ml der Substratlösung mit 3,1 µl H₂O₂ versetzt, für 1 min inkubiert und dann ein Röntgenfilm exponiert und entwickelt.

Anodenpuffer I:

30 mM Tris-HCl
 20 % (v/v) Methanol
 in H₂O, pH 9,4

Kathodenpuffer:

30 mM Tris-HCl
 40 mM 6-Aminohexansäure
 20 % (v/v) Methanol
 in H₂O, pH 9,4

Anodenpuffer II:

300 mM Tris-HCl
 20 % (v/v) Methanol
 in H₂O, pH 10,4

5.9.11 Ko-Präzipitation von Proteinkomplexen *in vitro*

Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens verschiedener Proteine aneinander kann man sie *in vitro* miteinander mischen und die entstandenen Komplexe mit spezifischen Antikörpern oder Affinitätsmatrices präzipitieren. Die zu fällenden Proteine wurden entweder rekombinant in Bakterien (5.9.6) oder mittels Baculoviren in Sf-9-Zellen (5.9.7) hergestellt und aufgereinigt (5.9.8), oder durch *in vitro* Translation hergestellt. Die potentiellen

Bindungspartner wurden in einem kleinen Volumen ($< 50 \mu\text{l}$) NP40-Puffer miteinander gemischt und für 30 min bei 30°C inkubiert. Währenddessen wurde Protein-A-Sepharose oder je nach eingesetztem Protein Glutathion-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in NP40-Puffer prääquilibriert. Das Gesamtvolumen der Lösung mit den zu fällenden Proteinen wurde auf 1 ml mit NP40-Puffer aufgefüllt und die entsprechende Matrix zugegeben. Bei Antikörperfällungen erfolgte ein Vorklären nur mit Protein-A-Sepharose, bevor zum „geklärten“ Überstand der spezifische Antikörper und neue Matrix zugegeben wurde. Nun wurde das Protein-Matrix-Gemisch für 2-3 h bei 4°C unter dauerndem Rotieren inkubiert. Darauf wurde die Matrix abzentrifugiert und dreimal mit NP40-Puffer gewaschen. Zuletzt wurde einmal mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 gewaschen und das Matrixpellet in 4x SDS-Laemmli-Probenpuffer oder Kinase-Puffer (5.9.13) aufgenommen. Bei Präzipitation mit Glutathion-Sepharose wurde dem 4x SDS-Laemmli-Probenpuffer 150 mM Glutathion zur Konkurrenz der Bindung an die Matrix und Freisetzung der gebundenen Proteine beigegeben. Ein Aliquot der so erhaltenen Suspension wurde dann durch SDS-PAGE (5.9.9) und Autoradiographie oder Immun-Blot (5.9.10) analysiert, um mögliche Bindung von Proteinen aneinander nachzuweisen.

5.9.12 Ko-Immunpräzipitation von Proteinkomplexen *in vivo*

Um *in vivo* Komplexe von Proteinen zu untersuchen, fällt man diese aus Zellextrakten mit spezifischen Antikörpern gegen ein Protein und detektiert die gebundenen Partnerproteine. Dazu inkubiert man ein Aliquot entsprechend 100 μg Gesamtproteinextrakt (5.9.3) in 1ml NP40-Puffer äquilibriert und mit vorgequollener, äquilibrierter Protein-A-Sepharose (entsprechend ca. 1 mg trockenem Sepharosepulver) für 30 min bei 4°C unter ständiger Bewegung. Nach Sedimentation der Sepharose wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem jeweiligen Antikörper (2-3 μg Antikörper/100 μg Gesamtproteinextrakt) für das gesuchte Protein wiederum bei 4°C rotierend für 60 min inkubiert. Daraufhin wurde erneut prääquilibrierte Protein-A-Sepharose zugegeben und weiterhin für 120 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose mit den an sie gebundenen Antikörper-Protein-Komplexen pelletiert und der Überstand verworfen. Die Sepharose-Kügelchen wurden dann dreimal mit NP40-Puffer, sowie einmal mit 10 mM Tris, pH 7,4 gewaschen und abschließend in 4x SDS-Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Die gefällten Proteinkomplexe wurden durch SDS-PAGE (5.9.9) und Immun-Blot (5.9.10) analysiert.

5.9.13 Kinase-Assay

Um die Aktivität von Kinasen, die enzymatisch einen Phosphatrest von ATP auf ihr Substrat übertragen, zu bestimmen, werden diese mit einem rekombinanten, aufgereinigten Substrat, sowie ATP inkubiert. Durch Zugabe eines Anteils ATP mit radioaktivem γ -Phosphatrest kann die Phosphorylierungsfunktion der Kinase autoradiographisch analysiert werden. Dazu wurden die Kinasekomplexe mit spezifischen Antikörpern (ko-) Immun-präzipitiert (5.9.11 oder 5.9.12). Das präzipitierte Gemisch aus Sepharose und gebundenen Proteinen wurde dann nach dem letzten Waschschriff in 40 μl Kinase-Puffer resuspendiert. Als Substrat wurde das gereinigte Protein Histon H1 (Roche Diagnostics, Mannheim) zugegeben (2 μg pro Reaktion). Um die Reaktion zu starten wurden 5 μl ATP-Lösung zugesetzt. Die Kinasereaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 45 μl , mit 50 μM ATP ($\text{ATP}/\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP} = 11250/1$) in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 37°C in einem Thermoblock für 30 min durchgeführt. Danach wurden 25 μl 4x SDS-Laemmli-Probenpuffer zum Abstoppen der Enzymreaktion zugegeben. Die Hälfte des Volumens wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (5.9.9) und autoradiographisch ausgewertet.

Kinase-Puffer:

50 mM	Hepes
10 mM	MgCl_2
1 mM	DTT
2,5 mM	EGTA
5 mM	MnCl_2
10 mM	β -Glycerophosphat
in	H_2O , pH 7,5

ATP-Lösung:

950 μM	ATP
1 μCi	$\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$
in	Kinase-Puffer

5.10 Arbeiten mit *S. cerevisiae*

5.10.1 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Routinemäßig wurden Hefen bei 30 °C in Brutschränken kultiviert, dabei wurden Flüssigkulturen bei 180-250 rpm geschüttelt oder auf einem rotierenden Rad bei 20-30 rpm bewegt. Zur Kultivierung wurde Vollmedium benutzt oder, bei Selektion, synthetisches Medium, dem die essentiellen Bestandteile fehlten (5.3.3). Synthetisches Medium enthielt zum besseren Wachstum zusätzlich alle nicht selektiven Aminosäuren bzw. Basen. Der Hefestamm Δ L1 konnte nur in Galactose-haltigen Medien wachsen, diesem wurde als besser verwertbare Zuckerquelle Raffinose zugefügt. Zur Repression des durch Methionin regulierbaren Met25-Promotoren wurde dem jeweiligen Medium L-Methionin (1mM Endkonzentration) zugesetzt. Zur Induktion des Met25-Promotors wurden die Hefen entweder in Abwesenheit von L-Methionin kultiviert oder nach Wachstum unter reprimierenden Bedingungen bei einer $\Delta E_{600} > 0,6$ pelletiert, 2x mit H₂O gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden, frischen Selektivmedium ohne L-Methionin für 5-6 h kultiviert.

5.10.2 Transformation von Hefezellen

Um rekombinante Plasmidvektoren in Hefezellen einzubringen wurden diese mittels der „Lithiumacetatmethode“ chemisch transformiert. Dazu wurde eine dichtgewachsene 2,5 ml Vorkultur in 100 ml Vollmedium verdünnt und diese bis zu einer $\Delta E_{600} = 0,6$ wachsen gelassen. Die Hefezellen wurden pelletiert (2000 rpm, 5 min), einmal mit H₂O gewaschen und dann in 1 ml TE/LiAc aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation und waschen mit TE/LiAc wurden die Hefen in TE/LiAc aufgenommen, so daß etwa eine Konzentration von 2×10^9 Zellen/ml entstand. Ein Transformationsansatz bestand aus:

50 μ l	Hefesuspension in TE/LiAc
5 μ l	Heringssperma-DNA (10 μ g/ μ l)
1 μ g	Plasmid-DNA
300 μ l	TE/LiAc/PEG

Dieses Gemisch wurde zunächst für 30 min bei 30 °C und nachfolgend weitere 15 min bei 42 °C inkubiert. Falls notwendig wurden nach der Inkubation bei 30 °C 44 μ l DMSO zur Verbesserung der Effizienz zugegeben und darauffolgend nur 10 min bei 42 °C inkubiert. Danach wurden 500 μ l TE zugegeben und die Hefezellen pelletiert, der Niederschlag in 100 μ l TE aufgenommen, davon 30 μ l auf den entsprechenden Selektivmedium-Platten ausgestrichen und diese für 3-5 Tage bei 30 °C in Brutschrank inkubiert bis makroskopisch Kolonien sichtbar wurden. Alle verwendeten Lösungen wurden jeweils frisch aus sterilen Stammlösungen hergestellt.

TE/LiAc :

10 mM	Tris
1 mM	EDTA
100 mM	LiAc
in	H ₂ O, pH 7,5

TE/LiAc/PEG:

10 mM	Tris
1 mM	EDTA
100 mM	LiAc
40 % (w/v)	PEG 4000
in	H ₂ O, pH 7,5

5.10.3 Etablieren von Hefeklonen

Die Kolonien einzelner Hefeklone wurden mit sterilen Einweg-Impfösen (Nunc, Wiesbaden) von den entsprechenden Platten genommen und in Flüssigmedium überführt. Davon ausgehend wurde entweder auf neue Selektivplatten ausgestrichen oder eine Flüssigkultur (5.10.1) angelegt. Die auf Selektivmedium-Agarplatten gewachsenen Kolonien konnten bis zu 3 Monate bei 4 °C gelagert und zum erneuten Animpfen von Flüssigkulturen wiederverwendet werden.

5.10.4 Einfrieren und Auftauen von Hefezellen

Zur Langzeitlagerung wurden 5 ml einer dichtgewachsenen Hefekultur für 3 min bei 3000 rpm abzentrifugiert und der Niederschlag in vierfach konzentriertem Vollmedium/Glyzerol im Verhältnis 1/1 (v/v) aufgenommen. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurden die Glyzeroldauerkulturen bei -80 °C gelagert. Um den jeweiligen Hefeklon wieder in Kultur zu nehmen wurde durch Abnehmen einer kleinen Menge von der Oberfläche der gefrorenen Glyzerolkultur genommen, in 50 μ l Flüssigmedium überführt, dieses auf einer entsprechenden Agarplatte ausgestrichen und bei 30 °C kultiviert.

5.11 Arbeiten mit Zellen in der Gewebekultur

5.11.1 Kultivierung und Passagierung von Zellen

Generell wurden alle verwendeten Zelllinien in Vollmedium (DMEM, mit 10 % FCS und 100 U/ml Penicillin und 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin) bei 37 °C, 5 % CO_2 und 90 % Luftfeuchtigkeit in Cytoperm Brutschränken (Heraeus Instruments, Hanau) kultiviert. Um adhärent wachsende Zellen zu vermehren und ihr Absterben durch Kontakthinhibition und verbrauchte Nährstoffe zu vermeiden mussten diese regelmäßig passagiert werden. Dazu wurde das überstehende Medium abgesaugt, der Zellmonolayer einmal mit PBS gespült und dann mit 0,5 % Trypsin/0,2 % EDTA für 2-5 min inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Kulturschalenboden gelöst hatten wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von 5 Volumen Vollmedium abgestoppt und die Zellsuspension verdünnt auf neue Schalen verteilt. Um eine genaue Anzahl Zellen auszusäen, wurde die Zellsuspension in sterile Polypropylenröhrchen überführt, abzentrifugiert und das Pellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellzahl pro Volumen wurde dann in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Anzahl Zellen in einer Zellkulturschale mit ausreichender Menge Vollmedium ausgesät. Alle Arbeiten mit Zellen wurden in einer Sicherheitswerkbank unter keimfreien Bedingungen, unter Verwendung von sterilen Plastikculturschalen (Nunc, Wiesbaden) und sterilisierten, mit Watte gestopften Glaspipetten durchgeführt.

5.11.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zelllinien langfristig zu lagern und nicht ständig kultivieren zu müssen, wurden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die adhärent wachsenden Zellen nach 5.11.1 mit Trypsin gelöst, abzentrifugiert und in Vollmedium/FCS/DMSO, 50/40/10, (v/v/v) aufgenommen. Je 1 ml einer solchen Zellsuspension wurde in ein Polypropylen-Einfriereröhrchen (Cryotube, Nunc, Wiesbaden) überführt. Diese wurden in einen Cryoeinfrierbehälter (Qualifreezer, Nunc, Wiesbaden) überführt und derselbe bei -80 °C eingefroren. Nach Abkühlen des Behälters wurden die Röhrchen zur dauerhaften Lagerung in einen Tank mit flüssigem N_2 transferiert. Um eine Zelllinie wieder in Kultur zu nehmen, wurde ein tiefgefrorenes Einfriereröhrchen in ein 37 °C-Wasserbad gegeben und der Inhalt sobald er sich verflüssigt hatte in 10 ml Vollmedium überführt. Entweder wurde die Zellsuspension direkt ausgesät oder bei empfindlicheren Zellen zunächst das DMSO des Einfriermediums entfernt, dazu wurden die Zellen zunächst pelletiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in frischem Vollmedium resuspendiert und dann erst in eine Zellkulturschale gegeben.

5.11.3 Transfektion von Zellen

(Chen und Okayama, 1987)

Um rekombinante Proteine in Säugerzellen zu exprimieren, wurden Plasmidvektoren, die entsprechende cDNAs enthielten in die Zellen transfiziert. Die in dieser Arbeit verwendeten adhärent wachsenden Zellen sind mit der sogenannten $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Methode transfiziert worden, dabei macht man sich die Aufnahme feinsten Partikel durch Phagozytose in die Zellen zu Nutze. Es wurden mindestens 3 h vor der eigentlichen Transfektion ca. 10^6 der zu transfizierenden Zellen in einer 10 cm Ø Kulturschale (bzw. dementsprechend weniger Zellen in kleineren Schalen) ausgesät und bei verminderter CO_2 -Konzentration von 3,5 % im Brutschrank inkubiert. Für die eigentliche Transfektion wurden zwei Lösungen in sterilen Reaktionsgefäßen vorgelegt:

- | | | | | | |
|----|----------------------|----------------------|----|-------------------|-----------------|
| a) | x μl | DNA-Lösung | b) | 400 μl | 2x HBS, pH 7,05 |
| | 48 μl | 2 M CaCl_2 | | | |
| | ad 400 μl | H_2O | | | |

Die eingesetzte Menge an DNA betrug zwischen 5 und 30 μg , je nach Größe der Zellkulturschale und Anzahl der zu transfizierenden Zellen. Die beiden Lösungen wurden unter Einblasen von Luft mit Hilfe einer Pipettierhilfe und sterilen Pasteurpipetten gemischt und danach tropfenweise zum Kulturmedium gegeben. Nach einer Inkubation von 12-16 h im Brutschrank konnte ein feiner Niederschlag beobachtet werden, der aus präzipitiertem Kalziumphosphat und $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -DNA-Komplexen bestand. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen, frisches Medium zugesetzt und erneut im Brutschrank bei normaler CO_2 -Konzentration von 5 % kultiviert. Nach weiteren 12-48 h Inkubation wurden die Zellen analysiert, d.h. zur Analyse der exprimierten Proteine nach 5.9.3, 5.9.9 & 5.9.10 behandelt, nach 5.11.9 für die Fluoreszenzanalyse präpariert oder nach 5.11.7 für die FACS-Analyse vorbereitet.

HBS 2x (Hepes gepufferte Salzlösung):

50 mM	Hepes
280 mM	NaCl
10 mM	KCl
1,5 mM	Na ₂ HPO ₄
12 mM	Glucose
in	H ₂ O, pH 7,05

5.11.4 Kontrolle der Transfektionseffizienz

Um die Transfektionseffizienz zu überprüfen, wurde immer eine Kulturschale mit Zellen mit dem Plasmid pZeolacZ (Invitrogen, Groningen, NL) transfiziert, das für das Enzym β -Galaktosidase kodiert. Diese Kulturschale wurde nach der Transfektion dreimal mit PBS gewaschen, die Zellen für 10 min mit 1 % Formaldehyd (v/v), 0,2 % (v/v) Glutaraldehyd in PBS fixiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurde Färbelösung zum Nachweis der enzymatischen Aktivität des transfizierten Proteins zugegeben und für 2-4 h bei 37 °C inkubiert. Abschließend konnte mikroskopisch die Menge an Zellen bestimmt werden, die durch den enzymatischen Umbau des farblosen chromogenen Substrates X-Gal zu einem blauen Indolfarbstoff gefärbt waren und deren prozentualer Anteil ein Maß für die Effizienz der Transfektion darstellt. Je nach eingesetzter Zelllinie konnten Transfektionsraten zwischen 1 % und 50 % erreicht werden.

Färbelösung:

750 μ g/ml	X-Gal
5 mM	K ₃ Fe(CN) ₆
5 mM	K ₄ Fe(CN) ₆
1 mM	MgCl ₂
in	PBS

5.11.5 REF-Transformations-Assay

Zur Bestimmung des onkogenen Potentials eines Genprodukts kann seine Kooperation mit konstitutiv aktivem Ha-Ras in der Transformation primärer Zellen herangezogen werden. Die so transformierten Zellen können die Kontaktinhibition überwinden, wachsen unkontrolliert als „wuchernde“ Zellhaufen und bilden sog. „Foci“, deren Anzahl als Maß für die Stärke des onkogenen Potential der eingebrachten Gene gilt. Diese Versuche werden in primären Ratten Embryo Fibroblasten (REFs) durchgeführt, da sich diese leicht präparieren und durch die Transfektion zweier Onkogene transformieren lassen (Land, *et al.*, 1983). Um REF-Zellen zu gewinnen, wurden trächtige Fisher-Ratten am Tag13 *post coitum* getötet und die Embryonen aus den Deziduen der Uteri isoliert. Die Embryonen wurden vom Dottersack und der Plazenta befreit und dann in PBS kurz gewaschen um Blut und Fruchtwasser zu entfernen. Darauf wurde der Kopf und alle inneren Organe entfernt. Der übrige Torso wurde dann mechanisch mit Skalpell oder zwischen zwei Objektträgern zerkleinert. Die Gewebestückchen wurden mit PBS gespült, dekantiert, der Überstand aufgehoben und das Gewebe anschließend viermal mit 20 ml 0,5 % Trypsin/0,2 % EDTA/1 % Hühnerserum (v/v/v) für 10 min bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde jeweils zu 30 ml Vollmedium gegeben. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in Vollmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die so präparierten Fibroblasten wurden dann zu $4-5 \times 10^6$ Zellen pro 15 cm Ø Kulturschale ausgesät und für 3-5 Tage bis zur Konfluenz kultiviert. Dann wurden die Zellen durch Trypsinierung von der Schale gelöst, vereinigt, abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert. Nun konnten die Zellen entweder durch Zugabe von FCS und DMSO (5.11.2) eingefroren werden oder wurden zu 9×10^5 Zellen pro 10 cm Ø Kulturschale ausgesät. Um ein Transformations-Experiment durchzuführen wurden die ausgesäten REF-Zellen mit Plasmiden kodierend für Ha-Ras (pGEJ6.6) und einem möglicherweise kooperierenden Onkogen (z.B. c-Myc im Vektor pLTR-MCS+) transfiziert (5.11.3). Nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 24 h mit Vollmedium kultiviert. Um die Transfektionseffizienz zu überprüfen wurde eine Kontrollschale mit pZeolacZ transfiziert und anschließend angefärbt (5.11.4). Daraufhin wurden die Zellen trypsiniert und die Zellen jeder Schale 1:4 aufgeteilt, erneut mit Vollmedium versehen und für 7-10 Tage inkubiert. Nach dieser Zeit konnten in der Positivkontrolle mit Ha-Ras + Myc oder Ha-Ras + SV40largeT transformierte Zellen, als Foci makroskopisch erkannt und ausgezählt werden. Als Negativkontrolle diente immer eine Transfektion die nur das Ha-Ras-Plasmid und den leeren pLTR-Vektor beinhaltete.

5.11.6 Etablierung von Zelllinien aus stabil transformierten REF

Um aus einem transformierten REF-Focus eine Zelllinie zu gewinnen, wurde ein solcher mit einer Pipette und ein wenig Trypsin von der Plate gelöst und in eine Vertiefung einer 24-Loch-Platte überführt. Sofern die Zellen dicht wuchsen und den transformierten Phänotyp (spindelförmig, stark lichtbrechend, geringe Oberflächenhaftung) aufwiesen, wurden sie weiter verdünnt auf grössere Kulturschalen und nach genügender Vermehrung als Dauerkultur tiefgefroren (5.11.2). Durch eine Immun-Blot-Analyse (5.9.9. & 5.9.10) wurde die Expression der transfizierten Plasmide in der neuen Zelllinie und die korrekte Transformation durch die eingebrachten, onkogen wirkenden cDNAs bestätigt. Die so gewonnenen Zelllinien wurden in der Anwesenheit des Fungizids Amphothericin kultiviert, um Pilzkontaminationen zu vermeiden.

5.11.7 Analyse des Zellzyklusverteilung mittels Durchflußzytometrie

Um Zellen auf ihren Status im Zellzyklus zu untersuchen wurde ein Durchflußzytometer (FACS) benutzt. Durch Messung der Fluoreszenz des in die DNA interkalierenden und dadurch fluoreszierenden Farbstoffes Propidiumiodid kann der DNA-Gehalt in einer Zelle mit diesem Gerät gemessen werden. Außerdem können über die Streuung und Beugung des Lichts durch die zu analysierenden Zellen Aussagen über die Größe und Granularität derselben gemacht werden. Zur Analyse der verschiedenen Zellzyklusphasen wurden in Kultur befindliche Zellen (evtl. nach Transfektion) durch Trypsininkubation (0,5-1 ml) von der Kulturschalenoberfläche gelöst und vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in ein 5 ml Polystyrolröhrchen überführt und zum Inaktivieren des Trypsins 3 ml Vollmedium oder PBS mit 10 % (v/v) FCS zugesetzt. Nach 5 min Zentrifugation bei 1000 g und RT wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 600 μ l PBS aufgenommen. Die Zellen wurden mit einem Schüttler vorsichtig aufgewirbelt und langsam 1,4 ml Ethanol als Fixans zugegeben. Daraufhin wurde die Zellsuspension in 70 %igem Alkohol für mindestens 12 h bei 4 °C gelagert. Um die Zellen anzufärben wurden sie nochmals pelletiert der Überstand verworfen und in 500-1000 μ l PI-Färbelösung (50 μ g/ml Propidiumiodid (PI), 0,1 mg/ml RNase A, in PBS) aufgenommen und 30 min bei RT unter Lichtausschluß inkubiert. Direkt im Anschluß erfolgte die Untersuchung im Durchflußzytometer.

Die Analysen erfolgten unter Verwendung eines FACScan Calibur oder eines FACScan Advantage und des Computerprogramms CellQuest. Dabei wurden zunächst über die Parameter Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (Größen- und Granularitätsmaße), lebende intakte Zellen elektronisch ausgewählt und mindestens 10.000 Signale (= Einzelzellen) aufgenommen. Der DNA-Gehalt der Zellen konnte dann über die Stärke der Fluoreszenz im 2. Fluoreszenzkanal (rotes Fluoreszenzlicht wird selektiv über Filter an einen Photomultiplier weitergeleitet) bestimmt, graphisch dargestellt und statistisch analysiert werden. Bei transfizierten Zellen wurde als Marker (im Verhältnis 5 + 1 (Effektor + Marker)) ein Plasmid gewählt, durch das ein grün fluoreszierendes Protein (Spektrin-GFP oder Us9-GFP) exprimiert wird, welches einen membranständigen Anteil besitzt (Brideau, *et al.*, 1998; Kalejta, *et al.*, 1999; Kalejta, *et al.*, 1997). So konnten auch nach Fixierung mit Alkohol in der Durchflußzytometrie die transfizierten Zellen analysiert werden, denn durch die Expression dieses Proteins an der Membran ging das grüne Fluoreszenzsignal nicht durch die Fixierung verloren. Durch elektronisches Auswählen der grün fluoreszierenden Zellen (Analyse im 1. Fluoreszenzkanal des FACS) konnte daher die Population der Zellen untersucht werden, die auch mit dem Plasmid des Interesses transfiziert war.

5.11.8 Zellproliferations-Assay

Um die Wachstumsgeschwindigkeit von Zellen (Denizot und Lang, 1986; Mosmann, 1983) oder die Hemmung derselben (Carmichael, *et al.*, 1987) in Kultur zu bestimmen wurde ein Test gewählt der auf dem Umbau des in Lösung gelben Farbstoffes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) zum Thiazolylblau durch die zelleigenen, mitochondrialen Dehydrogenasen beruht (Slater *et al.*, 1963). Nur lebende, intakte Zellen besitzen diese Enzyme in aktiver Form und daher kann der Umbau des MTT zum blauen Farbstoff und die durch ihn bewirkte ΔE_{570} als Maß für die Menge an lebenden Zellen in der Kultur gemessen werden. Die Zellen wurden in je 200 μ l RPMI1640 ausgesät (Auf Grund des unterschiedlichen Gehaltes an Salzen ist das sonst verwendete DMEM für diesen Test nicht geeignet, da es zum Ausfallen der Salze bei Zugabe des Lösungsmittels kommt.), wobei die 36 außen liegenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte nur mit Medium gefüllt wurden, um gleichmäßige Wachstumsbedingungen (gleiche Umgebung mit flüssigkeitsgefüllten Vertiefungen) in allen benutzten Vertiefungen zu gewährleisten. Nach Abschluß der Wachstumsphase wurden mit einer Mehrkanalpipette vorsichtig jeweils 100 μ l Flüssigkeit pro Vertiefung entnommen, wobei die Zellen am Boden haften blieben. Darauf wurden in jede Vertiefung 10 μ l einer Lösung von 5 mg MTT/ml RPMI1640

Medium gegeben und die Mikrotiterplatte für 2 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit je 100 μ l Lösungsmittel (2-Butanol/2-Propanol/1 N HCl, 16/8/1, (v/v/v)) aufgeschlossen und so der blaue Farbstoff gelöst. Dies wurde durch kurze Behandlung im Ultraschallbad und anschließendes kurzes Schütteln unterstützt. Die Absorption der erhaltenen farbigen Lösungen bei 570 nm wurde direkt in einem Mikrotiterplattenphotometer bestimmt, dabei diente jeweils eine Reihe der nicht mit Zellen beladenen außen liegenden Vertiefungen als Leerwert. Die Tests wurden zumeist als Dreifachbestimmung durchgeführt, so daß pro Mikrotiterplatte 20 x 3 verschiedene Versuchsansätze (unterschiedliche Zellzahlen als Ausgangsmenge oder Zusatz von Hemmsubstanzen in mehreren Konzentrationen, etc.) eingesetzt werden konnten. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel weiterverarbeitet.

5.11.9 Immunfluoreszenz- und Fluoreszenz-Präparation

Die Expression von Proteinen *in situ* kann durch Expression von Fusionsproteinen mit fluoreszierenden Proteinen wie GFP oder durch indirekte Immunfluoreszenz mit spezifischen Antikörpern im Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Dabei können sowohl stabil oder transient exprimierte, rekombinante Proteine, als auch endogene Proteine nachgewiesen werden. Nach Klonierung der PCR-generierten (5.8.14) cDNAs ohne Stopcodon in geeignete Vektoren (pEGFP-N3, pDsred1-N3 etc.) kodierten diese für chimäre Proteine die einen c-terminalen GFP- oder Dsred-Anteil besaßen. Nach Transfektion (5.11.3) der Plasmide für die fluoreszierenden Fusionsproteine, wurden die Zellen, die auf 24x60 mm Deckgläsern in 6 cm Ø Kulturschalen wuchsen, dreimal mit PBS gewaschen und dann für 10 min mit 1 % Formaldehyd (v/v), 0,2 % (v/v) Glutaraldehyd in PBS fixiert. Durch erneutes dreimaliges Waschen mit PBS wurde das Fixans entfernt. Die von überschüssiger Flüssigkeit befreiten Deckgläsern wurden mit Aquamount (BDH, Wesel) oder „mounting medium“ des Prolong® Antifade Kit (Molecular Probes, Leiden, NL) auf einen Glas-Objekträger aufgebracht, getrocknet und bei 4 °C gelagert werden.

Um Zellen für die Immunfluoreszenzanalyse vorzubereiten, wurden sie ebenfalls auf Deckgläsern (18 mm Ø) ausgesät und kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt, dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen mit eiskaltem Methanol/Aceton, 1/1, (v/v) für 10 min fixiert. Anschließend wurden die Präparate kurz an der Luft getrocknet und dann erneut dreimal mit PBS gespült, sowie mit 0,5 % (w/v) BSA in PBS für 30 min blockiert. Nun wurde der spezifische 1. Antikörper gegen das zu analysierende Protein in geeigneter Verdünnung (meist 1/50 - 1/200) in 0,5 % (w/v) BSA in PBS zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Darauf wurde dreimal mit PBS gewaschen und der fluoreszenzmarkierte (mit FITC oder Rhodamin) 2. Antikörper (Verdünnung 1/500 in 0,5 % (w/v) BSA in PBS) zugegeben und erneut bei RT im Dunklen für 1 h inkubiert. Nach neuerlichem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Deckgläsern aus der Kulturschale genommen, die überstehende Flüssigkeit entfernt, die Gläsern mit einem Eindeckelmittel auf einen Objekträger aufgebracht und trocken bei 4 °C unter Lichtausschluß gelagert.

5.11.10 Analyse von Proteininteraktionen mit dem 2-Hybrid-System

Um die Interaktion von Proteinen *in vivo* messen zu können nutzt man das 2-Hybrid-System in höheren eukaryontischen Zellen. Dabei wird eines der zu untersuchenden Proteine an eine DNA-bindende Proteindomäne (dbd) (hier die dbd des Gal4-Transkriptionsfaktors aus *S. cerevisiae*) fusioniert und das andere an eine transaktivierende Proteindomäne (hier VP16 des Herpes Simplex Virus). Die für diese beiden Hybridproteine kodierenden Plasmide wurden in geeignete Zellen (hier NIH 3T3 oder HeLa) transfiziert (5.11.3). Es wurden 50.000 Zellen in einer Vertiefung einer 12-Loch-Platte ausgesät und mit insgesamt 1 μ g DNA transfiziert. Bildet sich in den transfizierten Zellen ein Komplex aus den beiden zu analysierenden Proteinen, so besitzt dieser nun die Fähigkeit spezifisch an DNA zu binden und transaktivierend auf in der Nähe befindliche Promotoren zu wirken. Durch die Kotransfektion eines Reporterplasmids, mit der spezifischen Bindestelle für die eingesetzte dbd (hier 5x Gal4-dbd-Bindestelle) vor einem Minimal-Promotor und dem Luziferase-Gen, kann die Stärke der Interaktion der beiden zu analysierenden Hybridproteine an Hand der relativen Enzymaktivität der Luziferase gemessen werden. Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums mit PBS gewaschen und dann mit 100 μ l Lysispuffer (1 % Triton X-100, 1mM DTT, in H₂O) in der Schale lysiert. 10 μ l der Lösung wurden in ein geeignetes Polystyrolröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) gegeben und im Luminometer (EG & G Berthold, Bad Wildbad) nach Zugabe von 100 μ l Luziferinlösung analysiert. Die relativen Lichteinheiten (RLU, engl.: relative light unit) wurden über eine Meßzeit von 10 s integriert. Um die erhaltenen Werte zu normieren wurde ein Plasmid, kodierend für die β -Galaktosidase, kotransfiziert und in den gewonnenen Extrakten die Aktivität dieses Enzyms mit dem β -Gal Reporter Gene Assay (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers

luminometrisch analysiert. Zur Auswertung wurden die gemessenen RLU der Luziferase über die RLU der β -Galaktosidase normiert.

Luziferinlösung:

66 μ M	Luziferin (Promega, Mannheim)
2 mM	ATP
in	Luziferasepuffer

Luziferasepuffer:

100 mM	Tris/Acetat
10 mM	Magnesiumacetat
1 mM	EDTA
1 mM	EGTA
in	H ₂ O, pH 7,8

6. Literatur

- Adams P.D.** und **W.G. Kaelin.** (1998).
Negative control elements of the cell cycle in human tumors. *Curr Opin Cell Biol* 10, 791-7.
- Adkins J.N.** und **K.J. Lumb.** (2000).
Stoichiometry of cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 inhibition by p21(Cip1/Waf1). *Biochemistry* 39, 13925-30.
- Akama Y., W. Yasui, H. Kuniyasu, H. Yokozaki, M. Akagi, H. Tahara, et al.** (1996).
Genetic status and expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors in human gastric carcinoma cell lines. *Jpn J Cancer Res* 87, 824-30.
- Akama Y., W. Yasui, H. Yokozaki, H. Kuniyasu, K. Kitahara, T. Ishikawa, et al.** (1995).
Frequent amplification of the cyclin E gene in human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 86, 617-21.
- Albanese C., J. Johnson, G. Watanabe, N. Eklund, D. Vu, A. Arnold, et al.** (1995).
Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem* 270, 23589-97.
- Alcorta D.A., Y. Xiong, D. Phelps, G. Hannon, D. Beach und J.C. Barrett.** (1996).
Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13742-7.
- Alt J.R., J.L. Cleveland, M. Hannink und J.A. Diehl.** (2000).
Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev* 14, 3102-14.
- Andersen G., D. Busso, A. Poterszman, J.R. Hwang, J.M. Wurtz, R. Ripp, et al.** (1997).
The structure of cyclin H: common mode of kinase activation and specific features. *Embo J* 16, 958-67.
- Ashizawa S., H. Nishizawa, M. Yamada, H. Higashi, T. Kondo, H. Ozawa, et al.** (2001).
Collective inhibition of pRB family proteins by phosphorylation in cells with p16INK4a loss or cyclin E overexpression. *J Biol Chem* 4, 4.
- Autret S., A. Levine, I.B. Holland und S.J. Seror.** (1997).
Cell cycle checkpoints in bacteria. *Biochimie* 79, 549-54.
- Bai C., R. Richman und S.J. Elledge.** (1994).
Human cyclin F. *Embo J* 13, 6087-98.
- Bakiri L., D. Lallemand, E. Bossy-Wetzel und M. Yaniv.** (2000).
Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *Embo J* 19, 2056-68.
- Baldin V., J. Lukas, M.J. Marcote, M. Pagano und G. Draetta.** (1993).
Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 7, 812-21.
- Bastians H., F.M. Townsley und J.V. Ruderman.** (1998).
The cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) induces N-terminal proteolytic cleavage of cyclin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15374-81.
- Bates S., L. Bonetta, D. MacAllan, D. Parry, A. Holder, C. Dickson, et al.** (1994).
CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin- dependent kinases that associate with cyclin D1. *Oncogene* 9, 71-9.
- Baumgartner R., C. Fernandez-Catalan, A. Winoto, R. Huber, R.A. Engh und T.A. Holak.** (1998).
Structure of human cyclin-dependent kinase inhibitor p19INK4d: comparison to known ankyrin-repeat-containing structures and implications for the dysfunction of tumor suppressor p16INK4a. *Structure* 6, 1279-90.
- Bienz M.** (1999).
APC: the plot thickens. *Curr Opin Genet Dev* 9, 595-603.
- Birnboim H.C. und J. Doly.** (1979).
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-23.
- Blain S.W., E. Montalvo und J. Massague.** (1997).
Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4. *J Biol Chem* 272, 25863-72.

- Bodrug S.E., B.J. Warner, M.L. Bath, G.J. Lindeman, A.W. Harris und J.M. Adams. (1994).**
Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *Embo J* 13, 2124-30.
- Bonilla F., I. Orlow und C. Cordon-Cardo. (1998).**
Mutational study of p16CDKN2/MTS1/INK4A and p57KIP2 genes in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 12, 583-8.
- Bork P. (1993).**
Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? *Proteins* 17, 363-74.
- Bortner D.M. und M.P. Rosenberg. (1995).**
Overexpression of cyclin A in the mammary glands of transgenic mice results in the induction of nuclear abnormalities and increased apoptosis. *Cell Growth Differ* 6, 1579-89.
- Bortner D.M. und M.P. Rosenberg. (1997).**
Induction of mammary gland hyperplasia and carcinomas in transgenic mice expressing human cyclin E. *Mol Cell Biol* 17, 453-9.
- Bouchard C., K. Thieke, A. Maier, R. Saffrich, J. Hanley-Hyde, W. Ansorge, et al. (1999).**
Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J* 18, 5321-33.
- Bradford M.M. (1976).**
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Bresnahan W.A., I. Boldogh, E.A. Thompson und T. Albrecht. (1996).**
Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1. *Virology* 224, 150-60.
- Brideau A.D., B.W. Banfield und L.W. Enquist. (1998).**
The Us9 gene product of pseudorabies virus, an alphaherpesvirus, is a phosphorylated, tail-anchored type II membrane protein. *J Virol* 72, 4560-70.
- Brotherton D.H., V. Dhanaraj, S. Wick, L. Brizuela, P.J. Domaille, E. Volynik, et al. (1998).**
Crystal structure of the complex of the cyclin D-dependent kinase Cdk6 bound to the cell-cycle inhibitor p19INK4d. *Nature* 395, 244-50.
- Brown N.R., M.E. Noble, J.A. Endicott und L.N. Johnson. (1999).**
The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol* 1, 438-43.
- Buckley M.F., K.J. Sweeney, J.A. Hamilton, R.L. Sini, D.L. Manning, R.I. Nicholson, et al. (1993).**
Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene* 8, 2127-33.
- Carmichael J., W.G. DeGraff, A.F. Gazdar, J.D. Minna und J.B. Mitchell. (1987).**
Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47, 936-42.
- Carrano A.C., E. Eytan, A. Hershko und M. Pagano. (1999).**
SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* 1, 193-9.
- Carroll P.E., M. Okuda, H.F. Horn, P. Biddinger, P.J. Stambrook, L.L. Gleich, et al. (1999).**
Centrosome hyperamplification in human cancer: chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene* 18, 1935-44.
- Catzavelos C., N. Bhattacharya, Y.C. Ung, J.A. Wilson, L. Roncari, C. Sandhu, et al. (1997).**
Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med* 3, 227-30.
- Chan F.K., J. Zhang, L. Cheng, D.N. Shapiro und A. Winoto. (1995).**
Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol Cell Biol* 15, 2682-8.
- Chan W.Y., Q.R. Liu, J. Borjigin, H. Busch, O.M. Rennert, L.A. Tease, et al. (1989).**
Characterization of the cDNA encoding human nucleophosmin and studies of its role in normal and abnormal growth. *Biochemistry* 28, 1033-9.
- Chang Y., P.S. Moore, S.J. Talbot, C.H. Boshoff, T. Zarkowska, K. Godden, et al. (1996).**

Cyclin encoded by KS herpesvirus. *Nature* 382, 410.

Charrasse S., I. Carena, V. Brondani, K.H. Klempnauer und S. Ferrari. (2000). Degradation of B-Myb by ubiquitin-mediated proteolysis: involvement of the Cdc34-SCF(p45Skp2) pathway. *Oncogene* 19, 2986-95.

Chen C. und H. Okayama. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7, 2745-52.

Cheng M., P. Olivier, J.A. Diehl, M. Fero, M.F. Roussel, J.M. Roberts, *et al.* (1999). The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *Embo J* 18, 1571-83.

Cho N.H., Y.T. Kim und J.W. Kim. (1997). Correlation between G1 cyclins and HPV in the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 16, 339-47.

Clurman B.E., R.J. Sheaff, K. Thress, M. Groudine und J.M. Roberts. (1996). Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev* 10, 1979-90.

Coats S., W.M. Flanagan, J. Nourse und J.M. Roberts. (1996). Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science* 272, 877-80.

Coleman T.R. und W.G. Dunphy. (1994). Cdc2 regulatory factors. *Curr Opin Cell Biol* 6, 877-82.

De Bondt H.L., J. Rosenblatt, J. Jancarik, H.D. Jones, D.O. Morgan und S.H. Kim. (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 363, 595-602.

Dealy M.J., K.V. Nguyen, J. Lo, M. Gstaiger, W. Krek, D. Elson, *et al.* (1999). Loss of Cull1 results in early embryonic lethality and dysregulation of cyclin E. *Nat Genet* 23, 245-8.

DeGregori J., T. Kowalik und J.R. Nevins. (1995). Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol* 15, 4215-24.

Demetrick D.J., S. Matsumoto, G.J. Hannon, K. Okamoto, Y. Xiong, H. Zhang, *et al.* (1995). Chromosomal mapping of the genes for the human cell cycle proteins cyclin C (CCNC), cyclin E (CCNE), p21 (CDKN1) and KAP (CDKN3). *Cytogenet Cell Genet* 69, 190-2.

Deng C., P. Zhang, J.W. Harper, S.J. Elledge und P. Leder. (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675-84.

Denizot F. und R. Lang. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89, 271-7.

Diehl J.A., M. Cheng, M.F. Roussel und C.J. Sherr. (1998). Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12, 3499-511.

Diehl J.A. und C.J. Sherr. (1997). A dominant-negative cyclin D1 mutant prevents nuclear import of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and its phosphorylation by CDK-activating kinase. *Mol Cell Biol* 17, 7362-74.

Dobles M., V. Liberal, M.L. Scott, R. Benezra und P.K. Sorger. (2000). Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. *Cell* 101, 635-45.

Dong Y., L. Sui, Y. Tai, K. Sugimoto, T. Hirao und M. Tokuda. (2000). Prognostic significance of cyclin E overexpression in laryngeal squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 6, 4253-8.

Donnellan R. und R. Chetty. (1998). Cyclin D1 and human neoplasia. *Mol Pathol* 51, 1-7.

Donnellan R. und R. Chetty. (1999). Cyclin E in human cancers. *Faseb J* 13, 773-80.

- Dower W.J., J.F. Miller und C.W. Ragsdale. (1988).**
High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16, 6127-45.
- Draetta G., L. Brizuela, J. Potashkin und D. Beach. (1987).**
Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of fission yeast encoded by *cdc2+* and *suc1+*. *Cell* 50, 319-25.
- Drapkin R., G. Le Roy, H. Cho, S. Akoulitchiev und D. Reinberg. (1996).**
Human cyclin-dependent kinase-activating kinase exists in three distinct complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6488-93.
- Dulic V., W.K. Kaufmann, S.J. Wilson, T.D. Tlsty, E. Lees, J.W. Harper, *et al.* (1994).**
p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 76, 1013-23.
- Dulic V., E. Lees und S.I. Reed. (1992).**
Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* 257, 1958-61.
- Dunphy W.G., L. Brizuela, D. Beach und J. Newport. (1988).**
The *Xenopus cdc2* protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* 54, 423-31.
- Duronio R.J. und P.H. O'Farrell. (1995).**
Developmental control of the G1 to S transition in *Drosophila*: cyclin E is a limiting downstream target of E2F. *Genes Dev* 9, 1456-68.
- Dutta A., R. Chandra, L.M. Leiter und S. Lester. (1995).**
Cyclins as markers of tumor proliferation: immunocytochemical studies in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5386-90.
- Dyer M.A. und C.L. Cepko. (2000).**
p57(Kip2) regulates progenitor cell proliferation and amacrine interneuron development in the mouse retina. *Development* 127, 3593-605.
- Dyer M.A. und C.L. Cepko. (2001).**
The p57(Kip2) cyclin kinase inhibitor is expressed by a restricted set of amacrine cells in the rodent retina. *J Comp Neurol* 429, 601-14.
- Dynlacht B.D., O. Flores, J.A. Lees und E. Harlow. (1994).**
Differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes. *Genes Dev* 8, 1772-86.
- Dyson N. (1998).**
The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12, 2245-62.
- Eckstein J.V. (1995).**
From sequence to function - structural motifs of cell cycle proteins. In *Cell Cycle - Material and Methods*, M. Pagano, ed. (Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 186-99.
- El-Deiry W.S., J.W. Harper, P.M. O'Connor, V.E. Velculescu, C.E. Canman, J. Jackman, *et al.* (1994).**
WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54, 1169-74.
- El-Deiry W.S., T. Tokino, V.E. Velculescu, D.B. Levy, R. Parsons, J.M. Trent, *et al.* (1993).**
WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-25.
- El-Deiry W.S., T. Tokino, T. Waldman, J.D. Oliner, V.E. Velculescu, M. Burrell, *et al.* (1995).**
Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 55, 2910-9.
- Elledge S.J. und M.R. Spottswood. (1991).**
A new human p34 protein kinase, CDK2, identified by complementation of a *cdc28* mutation in *Saccharomyces cerevisiae*, is a homolog of *Xenopus* Eg1. *Embo J* 10, 2653-9.
- Ellis M., Y.P. Chew, L. Fallis, S. Freddersdorf, C. Boshoff, R.A. Weiss, *et al.* (1999).**
Degradation of p27(Kip) cdk inhibitor triggered by Kaposi's sarcoma virus cyclin-cdk6 complex. *Embo J* 18, 644-53.
- Endicott J.A., M.E. Noble und J.A. Tucker. (1999).**
Cyclin-dependent kinases: inhibition and substrate recognition. *Curr Opin Struct Biol* 9, 738-44.
- Erlanson M., C. Portin, B. Linderholm, J. Lindh, G. Roos und G. Landberg. (1998).**
Expression of cyclin E and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant lymphomas-prognostic implications. *Blood* 92, 770-7.

- Evans T.**, E.T. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel und T. Hunt. (1983).
Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389-96.
- Ewen M.E.** (2000).
Where the cell cycle and histones meet. *Genes Dev* 14, 2265-70.
- Fantl V.**, R. Smith, S. Brookes, C. Dickson und G. Peters. (1993).
Chromosome 11q13 abnormalities in human breast cancer. *Cancer Surv* 18, 77-94.
- Fantl V.**, G. Stamp, A. Andrews, I. Rosewell und C. Dickson. (1995).
Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev* 9, 2364-72.
- Fero M.L.**, E. Randel, K.E. Gurley, J.M. Roberts und C.J. Kemp. (1998).
The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* 396, 177-80.
- Fesquet D.**, J.C. Labbe, J. Derancourt, J.P. Capony, S. Galas, F. Girard, *et al.* (1993).
The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. *Embo J* 12, 3111-21.
- Firpo E.J.**, A. Koff, M.J. Solomon und J.M. Roberts. (1994).
Inactivation of a Cdk2 inhibitor during interleukin 2-induced proliferation of human T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 14, 4889-901.
- Fisher R.P.** und D.O. Morgan. (1994).
A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 78, 713-24.
- Flores-Rozas H.**, Z. Kelman, F.B. Dean, Z.Q. Pan, J.W. Harper, S.J. Elledge, *et al.* (1994).
Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8655-9.
- Fredersdorf S.**, J. Burns, A.M. Milne, G. Packham, L. Fallis, C.E. Gillett, *et al.* (1997).
High level expression of p27(kip1) and cyclin D1 in some human breast cancer cells: inverse correlation between the expression of p27(kip1) and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6380-5.
- Friend S.H.**, R. Bernards, S. Rogelj, R.A. Weinberg, J.M. Rapaport, D.M. Albert, *et al.* (1986).
A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323, 643-6.
- Fukuse T.**, T. Hirata, H. Naiki, S. Hitomi und H. Wada. (2000).
Prognostic significance of cyclin E overexpression in resected non- small cell lung cancer. *Cancer Res* 60, 242-4.
- Fung Y.K.**, A.L. Murphree, A. T'Ang, J. Qian, S.H. Hinrichs und W.F. Benedict. (1987).
Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science* 236, 1657-61.
- Funk J.O.** und D.A. Galloway. (1998).
Inhibiting CDK inhibitors: new lessons from DNA tumor viruses. *Trends Biochem Sci* 23, 337-41.
- Gallant P.** und E.A. Nigg. (1992).
Cyclin B2 undergoes cell cycle-dependent nuclear translocation and, when expressed as a non-destructible mutant, causes mitotic arrest in HeLa cells. *J Cell Biol* 117, 213-24.
- Garrett S.**, W.A. Barton, R. Knights, P. Jin, D.O. Morgan und R.P. Fisher. (2001).
Reciprocal Activation by Cyclin-Dependent Kinases 2 and 7 Is Directed by Substrate Specificity Determinants outside the T Loop. *Mol Cell Biol* 21, 88-99.
- Gautier J.**, J. Minshull, M. Lohka, M. Glotzer, T. Hunt und J.L. Maller. (1990).
Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* 60, 487-94.
- Gautier J.**, C. Norbury, M. Lohka, P. Nurse und J. Maller. (1988).
Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* 54, 433-9.
- Geng Y.**, E.N. Eaton, M. Picon, J.M. Roberts, A.S. Lundberg, A. Gifford, *et al.* (1996).
Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene* 12, 1173-80.
- Geng Y.**, W. Whoriskey, M.Y. Park, R.T. Bronson, R.H. Medema, T. Li, *et al.* (1999).
Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E. *Cell* 97, 767-77.

- Giordano A.**, P. Whyte, E. Harlow, B.R. Franza, Jr., D. Beach und G. Draetta. (1989). A 60 kd cdc2-associated polypeptide complexes with the E1A proteins in adenovirus-infected cells. *Cell* 58, 981-90.
- Girard F.**, U. Strausfeld, A. Fernandez und N.J. Lamb. (1991). Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67, 1169-79.
- Glotzer M.**, A.W. Murray und M.W. Kirschner. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-8.
- Goubin F.** und B. Ducommun. (1995). Identification of binding domains on the p21Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor. *Oncogene* 10, 2281-7.
- Gu Y.**, C.W. Turck und D.O. Morgan. (1993). Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 366, 707-10.
- Guan K.L.**, C.W. Jenkins, Y. Li, M.A. Nichols, X. Wu, C.L. O'Keefe, *et al.* (1994). Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* 8, 2939-52.
- Guan K.L.**, C.W. Jenkins, Y. Li, C.L. O'Keefe, S. Noh, X. Wu, *et al.* (1996). Isolation and characterization of p19INK4d, a p16-related inhibitor specific to CDK6 and CDK4. *Mol Biol Cell* 7, 57-70.
- Gudas J.M.**, M. Payton, S. Thukral, E. Chen, M. Bass, M.O. Robinson, *et al.* (1999). Cyclin E2, a novel G1 cyclin that binds Cdk2 and is aberrantly expressed in human cancers. *Mol Cell Biol* 19, 612-22.
- Guttridge D.C.**, C. Albanese, J.Y. Reuther, R.G. Pestell und A.S. Baldwin, Jr. (1999). NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 19, 5785-99.
- Haas K.**, C. Johannes, C. Geisen, T. Schmidt, H. Karsunky, S. Blass-Kampmann, *et al.* (1997a). Malignant transformation by cyclin E and Ha-Ras correlates with lower sensitivity towards induction of cell death but requires functional Myc and CDK4. *Oncogene* 15, 2615-23.
- Haas K.**, P. Staller, C. Geisen, J. Bartek, M. Eilers und T. Moroy. (1997b). Mutual requirement of CDK4 and Myc in malignant transformation: evidence for cyclin D1/CDK4 and p16INK4A as upstream regulators of Myc. *Oncogene* 15, 179-92.
- Halevy O.**, B.G. Novitch, D.B. Spicer, S.X. Skapek, J. Rhee, G.J. Hannon, *et al.* (1995). Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 267, 1018-21.
- Hall M.** und G. Peters. (1996). Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* 68, 67-108.
- Han E.K.**, M. Begemann, A. Sgambato, J.W. Soh, Y. Doki, W.Q. Xing, *et al.* (1996). Increased expression of cyclin D1 in a murine mammary epithelial cell line induces p27kip1, inhibits growth, and enhances apoptosis. *Cell Growth Differ* 7, 699-710.
- Hanahan D.** (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-80.
- Hanahan D.** und R.A. Weinberg. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanks S.K.** (1987). Homology probing: identification of cDNA clones encoding members of the protein-serine kinase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 388-92.
- Hannon G.J.** und D. Beach. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257-61.
- Hannon G.J.**, D. Demetrick und D. Beach. (1993). Isolation of the Rb-related p130 through its interaction with CDK2 and cyclins. *Genes Dev* 7, 2378-91.
- Hara E.**, R. Smith, D. Parry, H. Tahara, S. Stone und G. Peters. (1996). Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol* 16, 859-67.

- Harbour J.W. und D.C. Dean. (2000a).**
Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 2, E65-7.
- Harbour J.W. und D.C. Dean. (2000b).**
The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* 14, 2393-409.
- Hardwick K.G. (1998).**
The spindle checkpoint. *Trends Genet* 14, 1-4.
- Harper J.W. (1997).**
Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Surv* 29, 91-107.
- Harper J.W., G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi und S.J. Elledge. (1993).**
The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin- dependent kinases. *Cell* 75, 805-16.
- Harper J.W. und S.J. Elledge. (1996).**
Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 6, 56-64.
- Harper J.W., S.J. Elledge, K. Keyomarsi, B. Dynlacht, L.H. Tsai, P. Zhang, et al. (1995).**
Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell* 6, 387-400.
- Hartwell L.H., J. Culotti, J.R. Pringle und B.J. Reid. (1974).**
Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183, 46-51.
- Hartwell L.H. und T.A. Weinert. (1989).**
Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629-34.
- Harwell R.M., D.C. Porter, C. Danes und K. Keyomarsi. (2000).**
Processing of cyclin E differs between normal and tumor breast cells. *Cancer Res* 60, 481-9.
- Hatada I., J. Inazawa, T. Abe, M. Nakayama, Y. Kaneko, Y. Jinno, et al. (1996).**
Genomic imprinting of human p57KIP2 and its reduced expression in Wilms' tumors. *Hum Mol Genet* 5, 783-8.
- Hengst L., V. Dulic, J.M. Slingerland, E. Lees und S.I. Reed. (1994).**
A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5291-5.
- Hengst L. und S.I. Reed. (1996).**
Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* 271, 1861-4.
- Hengst L. und S.I. Reed. (1998).**
Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr Top Microbiol Immunol* 227, 25-41.
- Herber B., M. Truss, M. Beato und R. Muller. (1994).**
Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter. *Oncogene* 9, 2105-7.
- Hershko A. und A. Ciechanover. (1998).**
The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-79.
- Hinchcliffe E.H., C. Li, E.A. Thompson, J.L. Maller und G. Sluder. (1999).**
Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science* 283, 851-4.
- Hinz M., D. Krappmann, A. Eichten, A. Heder, C. Scheidereit und M. Strauss. (1999).**
NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol* 19, 2690-8.
- Hirai H., M.F. Roussel, J.Y. Kato, R.A. Ashmun und C.J. Sherr. (1995).**
Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* 15, 2672-81.
- Hirama T. und H.P. Koeffler. (1995).**
Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 86, 841-54.
- Hoffmann I., P.R. Clarke, M.J. Marcote, E. Karsenti und G. Draetta. (1993).**
Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *Embo J* 12, 53-63.
- Hunt T. (1991).**
Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Semin Cell Biol* 2, 213-22.
- Hunter T. und J. Pines. (1994).**
Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79, 573-82.

- Hussussian C.J., J.P. Struewing, A.M. Goldstein, P.A. Higgins, D.S. Ally, et al.** (1994).
Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 8, 15-21.
- Iavarone A. und J. Massague.** (1997).
Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature* 387, 417-22.
- Iida H., M. Towatari, M. Tanimoto, Y. Morishita, Y. Kidera und H. Saito.** (1997).
Overexpression of cyclin E in acute myelogenous leukemia. *Blood* 90, 3707-13.
- Jackman M.R. und J.N. Pines.** (1997).
Cyclins and the G2/M transition. *Cancer Surv* 29, 47-73.
- Jackson P.K., S. Chevalier, M. Philippe und M.W. Kirschner.** (1995).
Early events in DNA replication require cyclin E and are blocked by p21CIP1. *J Cell Biol* 130, 755-69.
- James M.C. und G. Peters.** (2000).
Alternative product of the p16/CKDN2A locus connects the Rb and p53 tumor suppressors. *Prog Cell Cycle Res* 4, 71-81.
- Jansen-Dürr P.** (1996).
How viral oncogenes make the cell cycle. *Trends Genet* 12, 270-5.
- Jeffrey P.D., A.A. Russo, K. Polyak, E. Gibbs, J. Hurwitz, J. Massague, et al.** (1995).
Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376, 313-20.
- Jin P., Y. Gu und D.O. Morgan.** (1996).
Role of inhibitory CDC2 phosphorylation in radiation-induced G2 arrest in human cells. *J Cell Biol* 134, 963-70.
- Johnson D.G.** (2000).
The paradox of E2F1: oncogene and tumor suppressor gene. *Mol Carcinog* 27, 151-7.
- Jones D.L., R.M. Alani und K. Munger.** (1997).
The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev* 11, 2101-11.
- Juan G. und C. Cordon-Cardo.** (2001).
Intranuclear compartmentalization of cyclin E during the cell cycle: disruption of the nucleoplasm-nucleolar shuttling of cyclin E in bladder cancer. *Cancer Res* 61, 1220-6.
- Kalejta R.F., A.D. Brideau, B.W. Banfield und A.J. Beavis.** (1999).
An integral membrane green fluorescent protein marker, Us9-GFP, is quantitatively retained in cells during propidium iodide-based cell cycle analysis by flow cytometry. *Exp Cell Res* 248, 322-8.
- Kalejta R.F., T. Shenk und A.J. Beavis.** (1997).
Use of a membrane-localized green fluorescent protein allows simultaneous identification of transfected cells and cell cycle analysis by flow cytometry. *Cytometry* 29, 286-91.
- Kamb A., N.A. Gruis, J. Weaver-Feldhaus, Q. Liu, K. Harshman, S.V. Tavtigian, et al.** (1994).
A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264, 436-40.
- Karsunky H., C. Geisen, T. Schmidt, K. Haas, B. Zevnik, E. Gau, et al.** (1999).
Oncogenic potential of cyclin E in T-cell lymphomagenesis in transgenic mice: evidence for cooperation between cyclin E and Ras but not Myc. *Oncogene* 18, 7816-24.
- Kastan M.B.** (1997).
Checkpoint controls and cancer. Introduction. *Cancer Surv* 29, 1-6.
- Kato J.Y., M. Matsuoka, K. Polyak, J. Massague und C.J. Sherr.** (1994).
Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 79, 487-96.
- Kelly B.L., K.G. Wolfe und J.M. Roberts.** (1998).
Identification of a substrate-targeting domain in cyclin E necessary for phosphorylation of the retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2535-40.
- Keyomarsi K., D. Conte, Jr., W. Toyofuku und M.P. Fox.** (1995).
Deregulation of cyclin E in breast cancer. *Oncogene* 11, 941-50.
- Keyomarsi K., N. O'Leary, G. Molnar, E. Lees, H.J. Fingert und A.B. Pardee.** (1994).
Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res* 54, 380-5.

- Keyomarsi K.** und A.B. Pardee. (1993).
Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1112-6.
- Kim K.K.**, H.M. Chamberlin, D.O. Morgan und S.H. Kim. (1996).
Three-dimensional structure of human cyclin H, a positive regulator of the CDK-activating kinase. *Nat Struct Biol* 3, 849-55.
- Kivinen L.** und M. Laiho. (1999).
Ras- and mitogen-activated protein kinase kinase-dependent and - independent pathways in p21Cip1/Waf1 induction by fibroblast growth factor-2, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor-beta1. *Cell Growth Differ* 10, 621-8.
- Kiyokawa H.**, R.D. Kineman, K.O. Manova-Todorova, V.C. Soares, E.S. Hoffman, M. Ono, *et al.* (1996).
Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell* 85, 721-32.
- Klotzbücher A.**, E. Stewart, D. Harrison und T. Hunt. (1996).
The 'destruction box' of cyclin A allows B-type cyclins to be ubiquitinated, but not efficiently destroyed. *Embo J* 15, 3053-64.
- Kobayashi H.**, E. Stewart, R. Poon, J.P. Adamczewski, J. Gannon und T. Hunt. (1992).
Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol Biol Cell* 3, 1279-94.
- Koepp D.M.**, J.W. Harper und S.J. Elledge. (1999).
How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* 97, 431-4.
- Koff A.**, F. Cross, A. Fisher, J. Schumacher, K. Leguellec, M. Philippe, *et al.* (1991).
Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell* 66, 1217-28.
- Koff A.**, A. Giordano, D. Desai, K. Yamashita, J.W. Harper, S. Elledge, *et al.* (1992).
Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257, 1689-94.
- Koh J.**, G.H. Enders, B.D. Dynlacht und E. Harlow. (1995).
Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature* 375, 506-10.
- Koi M.**, L.A. Johnson, L.M. Kalikin, P.F. Little, Y. Nakamura und A.P. Feinberg. (1993).
Tumor cell growth arrest caused by subchromosomal transferable DNA fragments from chromosome 11. *Science* 260, 361-4.
- Kouzarides T.** (1999).
Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev* 9, 40-8.
- Kranenburg O.**, R.P. de Groot, A.J. Van der Eb und A. Zantema. (1995).
Differentiation of P19 EC cells leads to differential modulation of cyclin-dependent kinase activities and to changes in the cell cycle profile. *Oncogene* 10, 87-95.
- Kraus B.**, M. Pohlschmidt, A.L. Leung, G.G. Germino, A. Snarey, M.C. Schneider, *et al.* (1994).
A novel cyclin gene (CCNF) in the region of the polycystic kidney disease gene (PKD1). *Genomics* 24, 27-33.
- Krek W.**, M.E. Ewen, S. Shirodkar, Z. Arany, W.G. Kaelin und D.M. Livingston. (1994).
Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell* 78, 161-72.
- Krude T.**, M. Jackman, J. Pines und R.A. Laskey. (1997).
Cyclin/Cdk-dependent initiation of DNA replication in a human cell-free system. *Cell* 88, 109-19.
- LaBaer J.**, M.D. Garrett, L.F. Stevenson, J.M. Slingerland, C. Sandhu, H.S. Chou, *et al.* (1997).
New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 11, 847-62.
- Lacey K.R.**, P.K. Jackson und T. Stearns. (1999).
Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2817-22.
- Laemmli U.K.** (1970).
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lai S.**, H. Goepfert, A.M. Gillenwater, M.A. Luna und A.K. El-Naggar. (2000).
Loss of imprinting and genetic alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor p57KIP2 gene in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 6, 3172-6.

- Land H.**, L.F. Parada und R.A. Weinberg. (1983).
Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596-602.
- Larner J.M.**, H. Lee und J.L. Hamlin. (1997).
S phase damage sensing checkpoints in mammalian cells. *Cancer Surv* 29, 25-45.
- Latres E.**, M. Malumbres, R. Sotillo, J. Martin, S. Ortega, J. Martin-Caballero, *et al.* (2000).
Limited overlapping roles of P15(INK4b) and P18(INK4c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. *Embo J* 19, 3496-506.
- Lauper N.**, A.R. Beck, S. Cariou, L. Richman, K. Hofmann, W. Reith, *et al.* (1998).
Cyclin E2: a novel CDK2 partner in the late G1 and S phases of the mammalian cell cycle. *Oncogene* 17, 2637-43.
- Le Cam L.**, J. Polanowska, E. Fabbrizio, M. Olivier, A. Philips, E. Ng Eaton, *et al.* (1999).
Timing of cyclin E gene expression depends on the regulated association of a bipartite repressor element with a novel E2F complex. *Embo J* 18, 1878-90.
- Lee M.G.**, C.J. Norbury, N.K. Spurr und P. Nurse. (1988).
Regulated expression and phosphorylation of a possible mammalian cell- cycle control protein. *Nature* 333, 676-9.
- Lee M.G.** und P. Nurse. (1987).
Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* 327, 31-5.
- Lee M.H.**, I. Reynisdottir und J. Massague. (1995).
Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 9, 639-49.
- Lee W.H.**, R. Bookstein, F. Hong, L.J. Young, J.Y. Shew und E.Y. Lee. (1987).
Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 235, 1394-9.
- Lees E.M.** und E. Harlow. (1993).
Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of *cdc2* kinase. *Mol Cell Biol* 13, 1194-201.
- Lehner C.F.** und P.H. O'Farrell. (1990).
The roles of Drosophila cyclins A and B in mitotic control. *Cell* 61, 535-47.
- Lew D.J.**, V. Dulic und S.I. Reed. (1991).
Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* 66, 1197-206.
- Lew D.J.** und S. Kornbluth. (1996).
Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* 8, 795-804.
- Li S.F.**, T. Shiozawa, K. Nakayama, T. Nikaido und S. Fujii. (1996a).
Stepwise abnormality of sex steroid hormone receptors, tumor suppressor gene products (p53 and Rb), and cyclin E in uterine endometrioid carcinoma. *Cancer* 77, 321-9.
- Li W.W.**, C. Cordon-Cardo, Q. Chen, S.C. Jhanwar und J.R. Bertino. (1996b).
Establishment, characterization and drug sensitivity of four new human soft tissue sarcoma cell lines. *Int J Cancer* 68, 514-9.
- Li Y.**, C.W. Jenkins, M.A. Nichols und Y. Xiong. (1994).
Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* 9, 2261-8.
- Lin J.**, C. Reichner, X. Wu und A.J. Levine. (1996).
Analysis of wild-type and mutant p21WAF-1 gene activities. *Mol Cell Biol* 16, 1786-93.
- Lingle W.L.**, W.H. Lutz, J.N. Ingle, N.J. Maihle und J.L. Salisbury. (1998).
Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2950-5.
- Lipinski M.M.** und T. Jacks. (1999).
The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene* 18, 7873-82.
- Liu M.**, M.H. Lee, M. Cohen, M. Bommakanti und L.P. Freedman. (1996).
Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev* 10, 142-53.

- Lloyd A.C.** (1998).
Ras versus cyclin-dependent kinase inhibitors. *Curr Opin Genet Dev* 8, 43-8.
- Lloyd R.V., L.A. Erickson, L. Jin, E. Kulig, X. Qian, J.C. Cheville, et al.** (1999).
p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol* 154, 313-23.
- Loden M., N.H. Nielsen, G. Roos, S.O. Emdin und G. Landberg.** (1999).
Cyclin E dependent kinase activity in human breast cancer in relation to cyclin E, p27 and p21 expression and retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene* 18, 2557-66.
- Lovec H., A. Grzeschiczek, M.B. Kowalski und T. Moroy.** (1994a).
Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *Embo J* 13, 3487-95.
- Lovec H., A. Sewing, F.C. Lucibello, R. Muller und T. Moroy.** (1994b).
Oncogenic activity of cyclin D1 revealed through cooperation with Ha- ras: link between cell cycle control and malignant transformation. *Oncogene* 9, 323-6.
- Lovicu F.J. und J.W. McAvoy.** (1999).
Spatial and temporal expression of p57(KIP2) during murine lens development. *Mech Dev* 86, 165-9.
- Lukas C., C.S. Sorensen, E. Kramer, E. Santoni-Rugiu, C. Lindeneg, J.M. Peters, et al.** (1999).
Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature* 401, 815-8.
- Lukas J., D. Parry, L. Aagaard, D.J. Mann, J. Bartkova, M. Strauss, et al.** (1995).
Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* 375, 503-6.
- Luo Y., J. Hurwitz und J. Massague.** (1995).
Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* 375, 159-61.
- Ma T., B.A. Van Tine, Y. Wei, M.D. Garrett, D. Nelson, P.D. Adams, et al.** (2000).
Cell cycle-regulated phosphorylation of p220(NPAT) by cyclin E/Cdk2 in Cajal bodies promotes histone gene transcription. *Genes Dev* 14, 2298-313.
- Ma Z.Q., S.S. Chua, F.J. DeMayo und S.Y. Tsai.** (1999).
Induction of mammary gland hyperplasia in transgenic mice over- expressing human Cdc25B. *Oncogene* 18, 4564-76.
- Macleod K.** (2000).
Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 10, 81-93.
- Mäkelä T.P., J. Partanen, M. Schwab und K. Alitalo.** (1992).
Plasmid pLTRpoly: a versatile high-efficiency mammalian expression vector. *Gene* 118, 293-4.
- Mäkelä T.P., J.P. Tassan, E.A. Nigg, S. Frutiger, G.J. Hughes und R.A. Weinberg.** (1994).
A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. *Nature* 371, 254-7.
- Maller J.L.** (1991).
Mitotic control. *Curr Opin Cell Biol* 3, 269-75.
- Mann D.J., E.S. Child, C. Swanton, H. Laman und N. Jones.** (1999).
Modulation of p27(Kip1) levels by the cyclin encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Embo J* 18, 654-63.
- Maridor G., P. Gallant, R. Golsteyn und E.A. Nigg.** (1993).
Nuclear localization of vertebrate cyclin A correlates with its ability to form complexes with cdk catalytic subunits. *J Cell Sci* 106, 535-44.
- Marshall C.** (1999).
How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry? *Curr Opin Cell Biol* 11, 732-6.
- Marti A., C. Wirbelauer, M. Scheffner und W. Krek.** (1999).
Interaction between ubiquitin-protein ligase SCFSKP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. *Nat Cell Biol* 1, 14-9.
- Martin L.G., G.W. Demers und D.A. Galloway.** (1998).
Disruption of the G1/S transition in human papillomavirus type 16 E7- expressing human cells is associated with altered regulation of cyclin E. *J Virol* 72, 975-85.

Masui Y. und **P. Wang.** (1998).

Cell cycle transition in early embryonic development of *Xenopus laevis*. *Biol Cell* 90, 537-48.

Mate J.L., A. Ariza, X. Roca, D. Lopez, C. Ferrandiz, J. Perez-Piteira, et al. (1998).

expression patterns of cyclins D1 and E in condyloma acuminatum in comparison with psoriatic proliferative lesions. *J Pathol* 184, 83-8.

Matsumoto M., M. Furihata, T. Ishikawa, Y. Ohtsuki und S. Ogoshi. (1999a).

Comparison of deregulated expression of cyclin D1 and cyclin E with that of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and CDK2 in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 80, 256-61.

Matsumoto M., M. Furihata, Y. Ohtsuki, S. Sasaguri und S. Ogoshi. (2000).

Immunohistochemical characterization of p57KIP2 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 20, 1947-52.

Matsumoto Y., K. Hayashi und E. Nishida. (1999b).

Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells. *Curr Biol* 9, 429-32.

Matsuoka S., M.C. Edwards, C. Bai, S. Parker, P. Zhang, A. Baldini, et al. (1995).

p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 9, 650-62.

Matsushime H., M.E. Ewen, D.K. Strom, J.Y. Kato, S.K. Hanks, M.F. Roussel, et al. (1992).

Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK- J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* 71, 323-34.

Matsushime H., D.E. Quelle, S.A. Shurtleff, M. Shibuya, C.J. Sherr und J.Y. Kato. (1994).

D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 14, 2066-76.

Matsushime H., M.F. Roussel, R.A. Ashmun und C.J. Sherr. (1991).

Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 65, 701-13.

McConnell B.B., F.J. Gregory, F.J. Stott, E. Hara und G. Peters. (1999).

Induced expression of p16(INK4a) inhibits both CDK4- and CDK2- associated kinase activity by reassortment of cyclin-CDK-inhibitor complexes. *Mol Cell Biol* 19, 1981-9.

McIntyre M.C., M.N. Ruesch und L.A. Laimins. (1996).

Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology* 215, 73-82.

Medema R.H., G.J. Kops, J.L. Bos und B.M. Burgering. (2000).

AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404, 782-7.

Meloni A.R., E.J. Smith und J.R. Nevins. (1999).

A mechanism for Rb/p130-mediated transcription repression involving recruitment of the CtBP corepressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9574-9.

Meyerson M., G.H. Enders, C.L. Wu, L.K. Su, C. Gorka, C. Nelson, et al. (1992).

A family of human cdc2-related protein kinases. *Embo J* 11, 2909-17.

Meyerson M. und E. Harlow. (1994).

Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* 14, 2077-86.

Michel L.S., V. Liberal, A. Chatterjee, R. Kirchwegger, B. Pasche, W. Gerald, et al. (2001).

MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* 409, 355-9.

Mitchison J.M. (1971).

The biology of the cell cycle: Cambridge University Press).

Molendini L., M.S. Benassi, G. Magagnoli, M. Merli, M.R. Sollazzo, P. Ragazzini, et al. (1998).

Prognostic significance of cyclin expression in human osteosarcoma. *Int J Oncol* 12, 1007-11.

Moore J.D., J. Yang, R. Truant und S. Kornbluth. (1999).

Nuclear import of Cdk/cyclin complexes: identification of distinct mechanisms for import of Cdk2/cyclin E and Cdc2/cyclin B1. *J Cell Biol* 144, 213-24.

Morgan D.O. (1995).

Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-4.

Morgan D.O. (1997).

Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 261-91.

Morris L., K.E. Allen und N.B. La Thangue. (2000).

Regulation of E2F transcription by cyclin E-Cdk2 kinase mediated through p300/CBP co-activators. *Nat Cell Biol* 2, 232-9.

Morse L., D. Chen, D. Franklin, Y. Xiong und S. Chen-Kiang. (1997).

Induction of cell cycle arrest and B cell terminal differentiation by CDK inhibitor p18(INK4c) and IL-6. *Immunity* 6, 47-56.

Mosmann T. (1983).

Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.

Motokura T., T. Bloom, H.G. Kim, H. Juppner, J.V. Ruderman, H.M. Kronenberg, et al. (1991).

A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* 350, 512-5.

Mowat M.R. (1998).

p53 in tumor progression: life, death, and everything. *Adv Cancer Res* 74, 25-48.

Mueller P.R., T.R. Coleman und W.G. Dunphy. (1995a).

Cell cycle regulation of a *Xenopus* Wee1-like kinase. *Mol Biol Cell* 6, 119-34.

Mueller P.R., T.R. Coleman, A. Kumagai und W.G. Dunphy. (1995b).

Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* 270, 86-90.

Müller-Tidow C., R. Metzger, K. Kugler, S. Diederichs, G. Idos, M. Thomas, et al. (2001).

Cyclin E is the only cyclin-dependent kinase 2-associated cyclin that predicts metastasis and survival in early stage non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 61, 647-53.

Mumberg D. (1995).

Untersuchungen zur Zellzyklus-regulatorischen Funktion von Cyclin E. In Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (Marburg: Philipps-Universität), pp. 1-157.

Mumberg D., K. Haas, T. Moroy, R. Niedenthal, J.H. Hegemann, M. Funk, et al. (1996).

Uncoupling of DNA replication and cell cycle progression by human cyclin E. *Oncogene* 13, 2493-7.

Mumberg D., R. Muller und M. Funk. (1994).

Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res* 22, 5767-8.

Mumberg D., R. Muller und M. Funk. (1995).

Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156, 119-22.

Mumberg D., M. Wick, C. Burger, K. Haas, M. Funk und R. Muller. (1997).

Cyclin ET, a new splice variant of human cyclin E with a unique expression pattern during cell cycle progression and differentiation. *Nucleic Acids Res* 25, 2098-105.

Murray A. (1995).

Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis. *Cell* 81, 149-52.

Murray A.W. (1992).

Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback control. *Nature* 359, 599-604.

Mussman J.G., H.F. Horn, P.E. Carroll, M. Okuda, P. Tarapore, L.A. Donehower, et al. (2000).

Synergistic induction of centrosome hyperamplification by loss of p53 and cyclin E overexpression. *Oncogene* 19, 1635-46.

Nakamura M., M. Katano, K. Fujimoto und T. Morisaki. (1997).

A new prognostic strategy for gastric carcinoma: mRNA expression of tumor growth-related factors in endoscopic biopsy specimens. *Ann Surg* 226, 35-42.

Nakamura T., R. Sanokawa, Y.F. Sasaki, D. Ayusawa, M. Oishi und N. Mori. (1995).

Cyclin I: a new cyclin encoded by a gene isolated from human brain. *Exp Cell Res* 221, 534-42.

Nakanishi M., R.S. Robetorye, G.R. Adami, O.M. Pereira-Smith und J.R. Smith. (1995).

Identification of the active region of the DNA synthesis inhibitory gene p21Sdi1/CIP1/WAF1. *Embo J* 14, 555-63.

- Nakayama K.** (1998). Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. *Bioessays* 20, 1020-9.
- Nakayama K., N. Ishida, M. Shirane, A. Inomata, T. Inoue, N. Shishido, et al.** (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 85, 707-20.
- Nakayama K., H. Nagahama, Y.A. Minamishima, M. Matsumoto, I. Nakamichi, K. Kitagawa, et al.** (2000). Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *Embo J* 19, 2069-81.
- Nielsen N.H., C. Arnerlov, S.O. Emdin und G. Landberg.** (1996). Cyclin E overexpression, a negative prognostic factor in breast cancer with strong correlation to oestrogen receptor status. *Br J Cancer* 74, 874-80.
- Nigg E.A.** (1996). Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr Opin Cell Biol* 8, 312-7.
- Ninomiya-Tsuji J., S. Nomoto, H. Yasuda, S.I. Reed und K. Matsumoto.** (1991). Cloning of a human cDNA encoding a CDC2-related kinase by complementation of a budding yeast cdc28 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9006-10.
- Noble M.E., J.A. Endicott, N.R. Brown und L.N. Johnson.** (1997). The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control. *Trends Biochem Sci* 22, 482-7.
- Nobori T., K. Miura, D.J. Wu, A. Lois, K. Takabayashi und D.A. Carson.** (1994). Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368, 753-6.
- Noda A., Y. Ning, S.F. Venable, O.M. Pereira-Smith und J.R. Smith.** (1994). Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 211, 90-8.
- Nourse J., E. Firpo, W.M. Flanagan, S. Coats, K. Polyak, M.H. Lee, et al.** (1994). Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 372, 570-3.
- Nurse P.** (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344, 503-8.
- Nurse P.** (2000). A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 100, 71-8.
- O'Connor P.M.** (1997). Mammalian G1 and G2 phase checkpoints. *Cancer Surv* 29, 151-82.
- O'Keefe D., D. Dao, L. Zhao, R. Sanderson, D. Warburton, L. Weiss, et al.** (1997). Coding mutations in p57KIP2 are present in some cases of Beckwith- Wiedemann syndrome but are rare or absent in Wilms tumors. *Am J Hum Genet* 61, 295-303.
- Ohtani K., J. DeGregori und J.R. Nevins.** (1995). Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12146-50.
- Ohtsubo M. und J.M. Roberts.** (1993). Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* 259, 1908-12.
- Ohtsubo M., A.M. Theodoras, J. Schumacher, J.M. Roberts und M. Pagano.** (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 15, 2612-24.
- Okuda M., H.F. Horn, P. Tarapore, Y. Tokuyama, A.G. Smulian, P.K. Chan, et al.** (2000). Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 103, 127-40.
- Orr-Weaver T.L.** (1994). Developmental modification of the Drosophila cell cycle. *Trends Genet* 10, 321-7.
- Pagano M., R. Pepperkok, F. Verde, W. Ansorge und G. Draetta.** (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J* 11, 961-71.

- Pagano M.**, S.W. Tam, A.M. Theodoras, P. Beer-Romero, G. Del Sal, V. Chau, *et al.* (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269, 682-5.
- Page A.M.** und P. Hieter. (1997). The anaphase promoting complex. *Cancer Surv* 29, 133-50.
- Palmero I.**, B. McConnell, D. Parry, S. Brookes, E. Hara, S. Bates, *et al.* (1997). Accumulation of p16INK4a in mouse fibroblasts as a function of replicative senescence and not of retinoblastoma gene status. *Oncogene* 15, 495-503.
- Parada L.F.**, C.J. Tabin, C. Shih und R.A. Weinberg. (1982). Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 297, 474-8.
- Pardee A.B.** (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246, 603-8.
- Parker L.L.**, P.J. Sylvestre, M.J. Byrnes, 3rd, F. Liu und H. Piwnica-Worms. (1995a). Identification of a 95-kDa WEE1-like tyrosine kinase in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9638-42.
- Parker S.B.**, G. Eichele, P. Zhang, A. Rawls, A.T. Sands, A. Bradley, *et al.* (1995b). p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* 267, 1024-7.
- Parry D.**, D. Mahony, K. Wills und E. Lees. (1999). Cyclin D-CDK subunit arrangement is dependent on the availability of competing INK4 and p21 class inhibitors. *Mol Cell Biol* 19, 1775-83.
- Pavletich N.P.** (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 287, 821-8.
- Perez-Roger I.**, S.H. Kim, B. Griffiths, A. Sewing und H. Land. (1999). Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *Embo J* 18, 5310-20.
- Phelps D.E.**, K.M. Hsiao, Y. Li, N. Hu, D.S. Franklin, E. Westphal, *et al.* (1998). Coupled transcriptional and translational control of cyclin-dependent kinase inhibitor p18INK4c expression during myogenesis. *Mol Cell Biol* 18, 2334-43.
- Pihan G.A.**, A. Purohit, J. Wallace, H. Knecht, B. Woda, P. Quesenberry, *et al.* (1998). Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res* 58, 3974-85.
- Pines J.** und T. Hunter. (1989). Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2. *Cell* 58, 833-46.
- Pines J.** und T. Hunter. (1990). Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* 346, 760-3.
- Pines J.** und T. Hunter. (1991). Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol* 115, 1-17.
- Pines J.** und T. Hunter. (1994). The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *Embo J* 13, 3772-81.
- Polyak K.**, J.Y. Kato, M.J. Solomon, C.J. Sherr, J. Massague, J.M. Roberts, *et al.* (1994a). p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8, 9-22.
- Polyak K.**, M.H. Lee, H. Erdjument-Bromage, A. Koff, J.M. Roberts, P. Tempst, *et al.* (1994b). Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78, 59-66.
- Poon R.Y.** und T. Hunter. (1995). Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase- interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. *Science* 270, 90-3.

- Poon R.Y., H. Toyoshima und T. Hunter. (1995).**
Redistribution of the CDK inhibitor p27 between different cyclin.CDK complexes in the mouse fibroblast cell cycle and in cells arrested with lovastatin or ultraviolet irradiation. *Mol Biol Cell* 6, 1197-213.
- Poon R.Y., K. Yamashita, J.P. Adamczewski, T. Hunt und J. Shuttleworth. (1993).**
The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2. *Embo J* 12, 3123-32.
- Porter D.C. und K. Keyomarsi. (2000).**
Novel splice variants of cyclin E with altered substrate specificity. *Nucleic Acids Res* 28, E101.
- Porter P.L., K.E. Malone, P.J. Heagerty, G.M. Alexander, L.A. Gatti, E.J. Firpo, et al. (1997).**
Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat Med* 3, 222-5.
- Prober D.A. und B.A. Edgar. (2001).**
Growth regulation by oncogenes - new insights from model organisms. *Curr Opin Genet Dev* 11, 19-26.
- Quade B.J., J.J. Park, C.P. Crum, D. Sun und A. Dutta. (1998).**
In vivo cyclin E expression as a marker for early cervical neoplasia. *Mod Pathol* 11, 1238-46.
- Quelle D.E., R.A. Ashmun, S.A. Shurtleff, J.Y. Kato, D. Bar-Sagi, M.F. Roussel, et al. (1993).**
Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev* 7, 1559-71.
- Quelle D.E., F. Zindy, R.A. Ashmun und C.J. Sherr. (1995).**
Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83, 993-1000.
- Rao S.S., C. Chu und D.S. Kohtz. (1994).**
Ectopic expression of cyclin D1 prevents activation of gene transcription by myogenic basic helix-loop-helix regulators. *Mol Cell Biol* 14, 5259-67.
- Ravitz M.J. und C.E. Wenner. (1997).**
Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF-beta. *Adv Cancer Res* 71, 165-207.
- Reed S.I. (1997).**
Control of the G1/S transition. *Cancer Surv* 29, 7-23.
- Reed S.I., J.A. Hadwiger und A.T. Lorincz. (1985).**
Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell division cycle gene CDC28. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4055-9.
- Rempel R.E., S.B. Sleight und J.L. Maller. (1995).**
Maternal Xenopus Cdk2-cyclin E complexes function during meiotic and early embryonic cell cycles that lack a G1 phase. *J Biol Chem* 270, 6843-55.
- Resnitzky D., M. Gossen, H. Bujard und S.I. Reed. (1994).**
Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* 14, 1669-79.
- Resnitzky D., L. Hengst und S.I. Reed. (1995).**
Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1. *Mol Cell Biol* 15, 4347-52.
- Resnitzky D. und S.I. Reed. (1995).**
Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. *Mol Cell Biol* 15, 3463-9.
- Reynaud E.G., M.P. Leibovitch, L.A. Tintignac, K. Pelpel, M. Guillier und S.A. Leibovitch. (2000).**
Stabilization of MyoD by direct binding to p57(Kip2). *J Biol Chem* 275, 18767-76.
- Reynaud E.G., K. Pelpel, M. Guillier, M.P. Leibovitch und S.A. Leibovitch. (1999).**
p57(Kip2) stabilizes the MyoD protein by inhibiting cyclin E-Cdk2 kinase activity in growing myoblasts. *Mol Cell Biol* 19, 7621-9.
- Reynisdottir I. und J. Massague. (1997).**
The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev* 11, 492-503.

- Reynisdottir I., K. Polyak, A. Iavarone und J. Massague. (1995).**
Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* 9, 1831-45.
- Riabowol K., G. Draetta, L. Brizuela, D. Vandre und D. Beach. (1989).**
The cdc2 kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells. *Cell* 57, 393-401.
- Roberts J.M. (1999).**
Evolving ideas about cyclins. *Cell* 98, 129-32.
- Rodriguez-Puebla M.L., A.I. Robles und C.J. Conti. (1999).**
ras activity and cyclin D1 expression: an essential mechanism of mouse skin tumor development. *Mol Carcinog* 24, 1-6.
- Rogers S., R. Wells und M. Rechsteiner. (1986).**
Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234, 364-8.
- Roussel M.F. (1998).**
Key effectors of signal transduction and G1 progression. *Adv Cancer Res* 74, 1-24.
- Ruas M. und G. Peters. (1998).**
The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1378, F115-77.
- Russo A.A., P.D. Jeffrey, A.K. Patten, J. Massague und N.P. Pavletich. (1996a).**
Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* 382, 325-31.
- Russo A.A., P.D. Jeffrey und N.P. Pavletich. (1996b).**
Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol* 3, 696-700.
- Russo A.A., L. Tong, J.O. Lee, P.D. Jeffrey und N.P. Pavletich. (1998).**
Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. *Nature* 395, 237-43.
- Saiki R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, *et al.* (1988).**
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.
- Sakaguchi T., A. Watanabe, H. Sawada, Y. Yamada, J. Yamashita, M. Matsuda, *et al.* (1998).**
Prognostic value of cyclin E and p53 expression in gastric carcinoma. *Cancer* 82, 1238-43.
- Sala A., M. Kundu, I. Casella, A. Engelhard, B. Calabretta, L. Grasso, *et al.* (1997).**
Activation of human B-MYB by cyclins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 532-6.
- Sambrook J., E.F. Fritsch und T. Maniatis. (1989).**
Molecular Cloning, 2nd Edition: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Saville M.K. und R.J. Watson. (1998).**
The cell-cycle regulated transcription factor B-Myb is phosphorylated by cyclin A/Cdk2 at sites that enhance its transactivation properties. *Oncogene* 17, 2679-89.
- Schuermann M. (1990).**
An expression vector system for stable expression of oncogenes. *Nucleic Acids Res* 18, 4945-6.
- Schulman B.A., A.C. Carrano, P.D. Jeffrey, Z. Bowen, E.R. Kinnucan, M.S. Finnin, *et al.* (2000).**
Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature* 408, 381-6.
- Schulman B.A., D.L. Lindstrom und E. Harlow. (1998).**
Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10453-8.
- Scott K.A. und R.A. Walker. (1997).**
Lack of cyclin E immunoreactivity in non-malignant breast and association with proliferation in breast cancer. *Br J Cancer* 76, 1288-92.
- Scuderi R., K.A. Palucka, K. Pokrovskaja, M. Bjorkholm, K.G. Wiman und P. Pisa. (1996).**
Cyclin E overexpression in relapsed adult acute lymphoblastic leukemias of B-cell lineage. *Blood* 87, 3360-7.
- Seghezzi W., K. Chua, F. Shanahan, O. Gozani, R. Reed und E. Lees. (1998).**
Cyclin E associates with components of the pre-mRNA splicing machinery in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 18, 4526-36.

- Serrano M.**, G.J. Hannon und D. Beach. (1993).
A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704-7.
- Serrano M.**, H. Lee, L. Chin, C. Cordon-Cardo, D. Beach und R.A. DePinho. (1996).
Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 85, 27-37.
- Serrano M.**, A.W. Lin, M.E. McCurrach, D. Beach und S.W. Lowe. (1997).
Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
- Sewing A.**, V. Ronicke, C. Burger, M. Funk und R. Muller. (1994).
Alternative splicing of human cyclin E. *J Cell Sci* 107, 581-8.
- Sewing A.**, B. Wiseman, A.C. Lloyd und H. Land. (1997).
High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol* 17, 5588-97.
- Sgambato A.**, Y. Doki, I. Schieren und I.B. Weinstein. (1997).
Effects of cyclin E overexpression on cell growth and response to transforming growth factor beta depend on cell context and p27Kip1 expression. *Cell Growth Differ* 8, 393-405.
- Sharpless N.E.** und R.A. DePinho. (1999).
The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* 9, 22-30.
- Sheaff R.J.**, M. Groudine, M. Gordon, J.M. Roberts und B.E. Clurman. (1997).
Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev* 11, 1464-78.
- Sherr C.J.** (1993).
Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73, 1059-65.
- Sherr C.J.** (1994).
G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79, 551-5.
- Sherr C.J.** (1996).
Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-7.
- Sherr C.J.** (2000).
The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 60, 3689-95.
- Sherr C.J.** und J.M. Roberts. (1995).
Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9, 1149-63.
- Sherr C.J.** und J.M. Roberts. (1999).
CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-12.
- Sherr C.J.** und J.D. Weber. (2000).
The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* 10, 94-9.
- Shin J.Y.**, H.S. Kim, K.S. Lee, J. Kim, J.B. Park, M.H. Won, *et al.* (2000).
Mutation and expression of the p27KIP1 and p57KIP2 genes in human gastric cancer. *Exp Mol Med* 32, 79-83.
- Sicinski P.**, J.L. Donaher, S.B. Parker, T. Li, A. Fazeli, H. Gardner, *et al.* (1995).
Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* 82, 621-30.
- Simanis V.** und P. Nurse. (1986).
The cell cycle control gene *cdc2+* of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation. *Cell* 45, 261-8.
- Singer J.D.**, M. Gurian-West, B. Clurman und J.M. Roberts. (1999).
Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes Dev* 13, 2375-87.
- Sirzen F.**, T. Heiden, A. Nilsson, J. Bergh, S. Skog und R. Lewensohn. (1997).
Characterisation of the G1/S cell cycle checkpoint defect in lung carcinoma cells with different intrinsic radiosensitivities. *Anticancer Res* 17, 3381-6.
- Skapek S.X.**, J. Rhee, D.B. Spicer und A.B. Lassar. (1995).
Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin D1-dependent kinase. *Science* 267, 1022-4.
- Slater T.F.**, Sawyer B. und Sträuli U. (1963)
Studies on succinate-tetrazolium reductase systems III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim. Biophys. Acta* 77, 383-393

- Slingerland J.** und M. Pagano. (2000). Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol* 183, 10-7.
- Smith E.**, B. Frenkel, T.K. MacLachlan, A. Giordano, J.L. Stein, J.B. Lian, *et al.* (1997). Post-proliferative cyclin E-associated kinase activity in differentiated osteoblasts: inhibition by proliferating osteoblasts and osteosarcoma cells. *J Cell Biochem* 66, 141-52.
- Smith M.L.** und Y.R. Seo. (2000). Sensitivity of cyclin E-overexpressing cells to cisplatin/taxol combinations. *Anticancer Res* 20, 2537-9.
- Sofer-Levi Y.** und D. Resnitzky. (1996). Apoptosis induced by ectopic expression of cyclin D1 but not cyclin E. *Oncogene* 13, 2431-7.
- Solomon M.J.**, J.W. Harper und J. Shuttleworth. (1993). CAK, the p34cdc2 activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40MO15. *Embo J* 12, 3133-42.
- Solomon M.J.**, T. Lee und M.W. Kirschner. (1992). Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. *Mol Biol Cell* 3, 13-27.
- Soos T.J.**, H. Kiyokawa, J.S. Yan, M.S. Rubin, A. Giordano, A. DeBlasio, *et al.* (1996). Formation of p27-CDK complexes during the human mitotic cell cycle. *Cell Growth Differ* 7, 135-46.
- Soufir N.**, M.F. Avril, A. Chompret, F. Demenais, J. Bombled, A. Spatz, *et al.* (1998). Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group. *Hum Mol Genet* 7, 209-16.
- Spector D.L.**, R.L. Ochs und H. Busch. (1984). Silver staining, immunofluorescence, and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23. *Chromosoma* 90, 139-48.
- Spruck C.H.**, K.A. Won und S.I. Reed. (1999). Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature* 401, 297-300.
- Sutherland R.L.**, J.A. Hamilton, K.J. Sweeney, C.K. Watts und E.A. Musgrove. (1995). Expression and regulation of cyclin genes in breast cancer. *Acta Oncol* 34, 651-6.
- Sutterluty H.**, E. Chatelain, A. Marti, C. Wirbelauer, M. Senften, U. Muller, *et al.* (1999). p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat Cell Biol* 1, 207-14.
- Svejstrup J.Q.**, P. Vichi und J.M. Egly. (1996). The multiple roles of transcription/repair factor TFIIH. *Trends Biochem Sci* 21, 346-50.
- Swanton C.**, D.J. Mann, B. Fleckenstein, F. Neipel, G. Peters und N. Jones. (1997). Herpes viral cyclin/Cdk6 complexes evade inhibition by CDK inhibitor proteins. *Nature* 390, 184-7.
- Sweeney K.J.**, A. Swarbrick, R.L. Sutherland und E.A. Musgrove. (1998). Lack of relationship between CDK activity and G1 cyclin expression in breast cancer cells. *Oncogene* 16, 2865-78.
- Tabin C.J.**, S.M. Bradley, C.I. Bargmann, R.A. Weinberg, A.G. Papageorge, E.M. Scolnick, *et al.* (1982). Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300, 143-9.
- Takahashi K.**, T. Kobayashi und N. Kanayama. (2000). p57(Kip2) regulates the proper development of labyrinthine and spongiotrophoblasts. *Mol Hum Reprod* 6, 1019-25.
- Takizawa C.G.** und D.O. Morgan. (2000). Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1- cdk1 and cdc25C. *Curr Opin Cell Biol* 12, 658-65.
- Tam S.W.** und R. Schlegel. (1992). Staurosporine overrides checkpoints for mitotic onset in BHK cells. *Cell Growth Differ* 3, 811-7.
- Tam S.W.**, A.M. Theodoras, J.W. Shay, G.F. Draetta und M. Pagano. (1994). Differential expression and regulation of Cyclin D1 protein in normal and tumor human cells: association with Cdk4 is required for Cyclin D1 function in G1 progression. *Oncogene* 9, 2663-74.
- Tan P.**, B. Cady, M. Wanner, P. Worland, B. Cukor, C. Magi-Galluzzi, *et al.* (1997). The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 57, 1259-63.

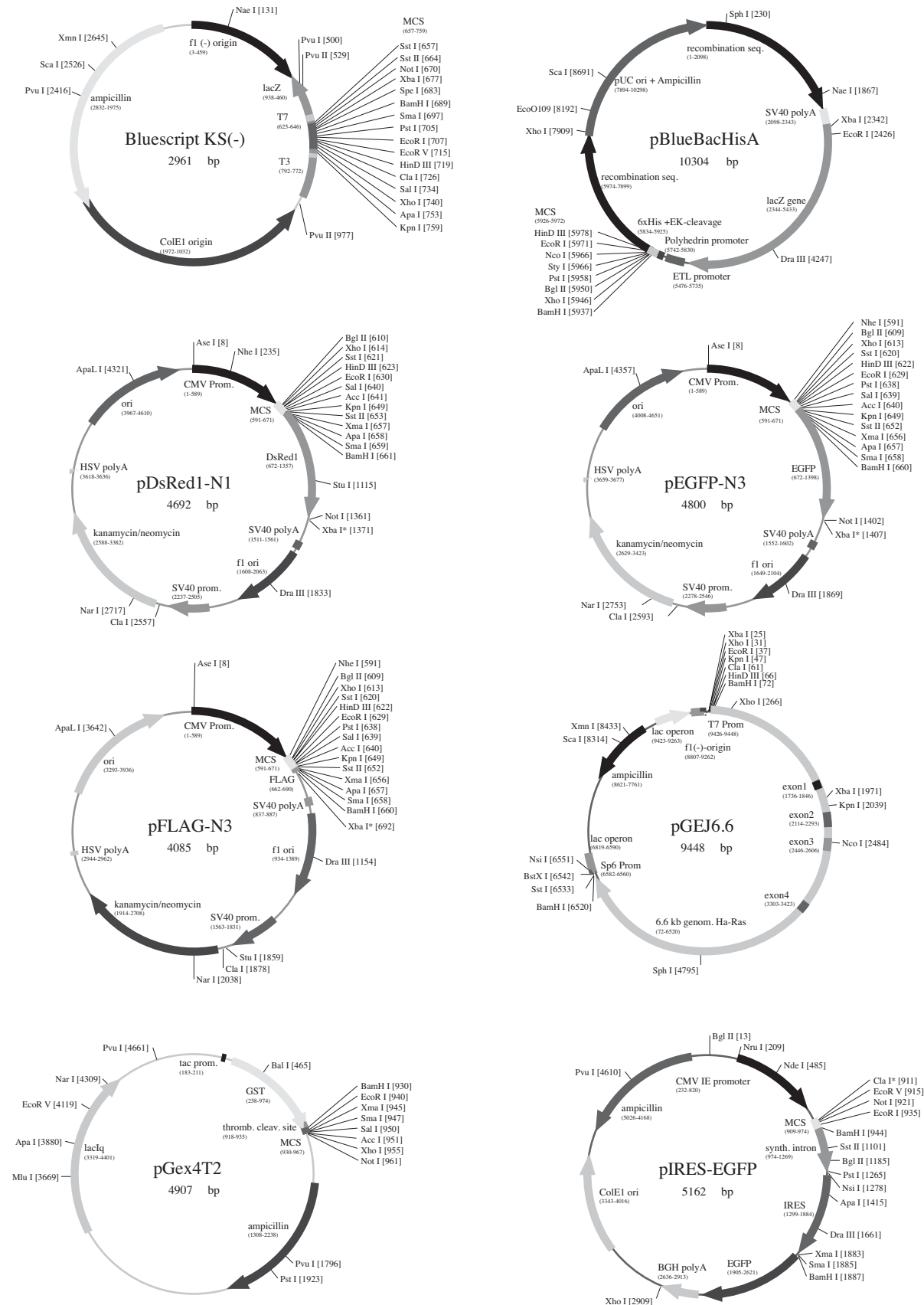
- Tassan J.P., S.J. Schultz, J. Bartek und E.A. Nigg.** (1994).
Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). *J Cell Biol* 127, 467-78.
- Terada Y., M. Tatsuka, S. Jinno und H. Okayama.** (1995).
Requirement for tyrosine phosphorylation of Cdk4 in G1 arrest induced by ultraviolet irradiation. *Nature* 376, 358-62.
- Thompson J.S., K.J. Reese, M.R. DeBaun, E.J. Perlman und A.P. Feinberg.** (1996).
Reduced expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p57KIP2 in Wilms' tumor. *Cancer Res* 56, 5723-7.
- Thullberg M., J. Bartek und J. Lukas.** (2000).
Ubiquitin/proteasome-mediated degradation of p19INK4d determines its periodic expression during the cell cycle. *Oncogene* 19, 2870-6.
- Tokuyama Y., H.F. Henning, K. Kawamura, P. Tarapore und K. Fukasawa.** (2001).
Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr199 by CDK2/cyclin E, and its role in centrosome duplication. *J Biol Chem* 27, 27.
- Toyoshima H. und T. Hunter.** (1994).
p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78, 67-74.
- Tsai L.H., E. Harlow und M. Meyerson.** (1991).
Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase. *Nature* 353, 174-7.
- Tsao H., E. Benoit, A.J. Sober, C. Thiele und F.G. Haluska.** (1998).
Novel mutations in the p16/CDKN2A binding region of the cyclin- dependent kinase-4 gene. In *Cancer Res*, pp. 109-13. Tsao H., E. Benoit, A.J. Sober, C. Thiele und F.G. Haluska
- Tsihlias J., L. Kapusta und J. Slingerland.** (1999).
The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med* 50, 401-23.
- Tsugu A., K. Sakai, P.B. Dirks, S. Jung, R. Weksberg, Y.L. Fei, et al.** (2000).
Expression of p57(KIP2) potently blocks the growth of human astrocytomas and induces cell senescence. *Am J Pathol* 157, 919-32.
- Urano T., H. Yashiroda, M. Muraoka, K. Tanaka, T. Hosoi, S. Inoue, et al.** (1999).
p57(Kip2) is degraded through the proteasome in osteoblasts stimulated to proliferation by transforming growth factor beta1. *J Biol Chem* 274, 12197-200.
- Venkataramani R., K. Swaminathan und R. Marmorstein.** (1998).
Crystal structure of the CDK4/6 inhibitory protein p18INK4c provides insights into ankyrin-like repeat structure/function and tumor-derived p16INK4 mutations. *Nat Struct Biol* 5, 74-81.
- Vlach J., S. Hennecke und B. Amati.** (1997).
Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Embo J* 16, 5334-44.
- Vogt B., K. Zerfass-Thome, A. Schulze, J.W. Botz, W. Zwerschke und P. Jansen-Durr.** (1999).
Regulation of cyclin E gene expression by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Gen Virol* 80, 2103-13.
- Waga S., G.J. Hannon, D. Beach und B. Stillman.** (1994).
The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369, 574-8.
- Wang A., N. Yoshimi, M. Suzui, A. Yamauchi, M. Tarao und H. Mori.** (1996).
Different expression patterns of cyclins A, D1 and E in human colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 122, 122-6.
- Wang D., J.L. Russell und D.G. Johnson.** (2000).
E2F4 and E2F1 have similar proliferative properties but different apoptotic and oncogenic properties in vivo. *Mol Cell Biol* 20, 3417-24.
- Wang T.C., R.D. Cardiff, L. Zukerberg, E. Lees, A. Arnold und E.V. Schmidt.** (1994).
Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature* 369, 669-71.
- Wang Y., S. Penfold, X. Tang, N. Hattori, P. Riley, J.W. Harper, et al.** (1999).
Deletion of the Cul1 gene in mice causes arrest in early embryogenesis and accumulation of cyclin E. *Curr Biol* 9, 1191-4.

- Warbrick E., D.P. Lane, D.M. Glover und L.S. Cox.** (1995).
A small peptide inhibitor of DNA replication defines the site of interaction between the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1 and proliferating cell nuclear antigen. *Curr Biol* 5, 275-82.
- Wassmann K. und R. Benezra.** (2001).
Mitotic checkpoints: from yeast to cancer. *Curr Opin Genet Dev* 11, 83-90.
- Weinberg R.A.** (1995).
The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-30.
- Weinert T.** (1998).
DNA damage and checkpoint pathways: molecular anatomy and interactions with repair. *Cell* 94, 555-8.
- Wimmel A., F.C. Lucibello, A. Sewing, S. Adolph und R. Muller.** (1994).
Inducible acceleration of G1 progression through tetracycline-regulated expression of human cyclin E. *Oncogene* 9, 995-7.
- Winey M.** (1999).
Cell cycle: driving the centrosome cycle. *Curr Biol* 9, R449-52.
- Winston J., F. Dong und W.J. Pledger.** (1996).
Differential modulation of G1 cyclins and the Cdk inhibitor p27kip1 by platelet-derived growth factor and plasma factors in density-arrested fibroblasts. *J Biol Chem* 271, 11253-60.
- Winston J.T., C. Chu und J.W. Harper.** (1999).
Culprits in the degradation of cyclin E apprehended. *Genes Dev* 13, 2751-7.
- Wölfel T., M. Hauer, J. Schneider, M. Serrano, C. Wölfel, E. Klehmann-Hieb, et al.** (1995).
A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269, 1281-4.
- Wolowiec D., M. Benchaib, P. Pernas, P. Deviller, C. Souchier, R. Rimokh, et al.** (1995).
Expression of cell cycle regulatory proteins in chronic lymphocytic leukemias. Comparison with non-Hodgkin's lymphomas and non-neoplastic lymphoid tissue. *Leukemia* 9, 1382-8.
- Won K.A. und S.I. Reed.** (1996).
Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *Embo J* 15, 4182-93.
- Woods D., D. Parry, H. Cherwinski, E. Bosch, E. Lees und M. McMahon.** (1997).
Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol* 17, 5598-611.
- Xiong Y., T. Connolly, B. Futcher und D. Beach.** (1991).
Human D-type cyclin. *Cell* 65, 691-9.
- Xiong Y., G.J. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi und D. Beach.** (1993a).
p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-4.
- Xiong Y., H. Zhang und D. Beach.** (1992).
D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 71, 505-14.
- Xiong Y., H. Zhang und D. Beach.** (1993b).
Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes Dev* 7, 1572-83.
- Yam C.H., W.Y. Siu, D. Kaganovich, J.V. Ruderman und R.Y. Poon.** (2001).
Cleavage of cyclin A at R70/R71 by the bacterial protease OmpT. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 497-501.
- Yang J., E.S. Bardes, J.D. Moore, J. Brennan, M.A. Powers und S. Kornbluth.** (1998).
Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev* 12, 2131-43.
- Yao Y., E.D. Slosberg, L. Wang, H. Hibshoosh, Y.J. Zhang, W.Q. Xing, et al.** (1999).
Increased susceptibility to carcinogen-induced mammary tumors in MMTV- Cdc25B transgenic mice. *Oncogene* 18, 5159-66.
- Yasui W., Y. Kudo, S. Semba, H. Yokozaki und E. Tahara.** (1997).
Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is associated with advanced stage and invasiveness of gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 88, 625-9.

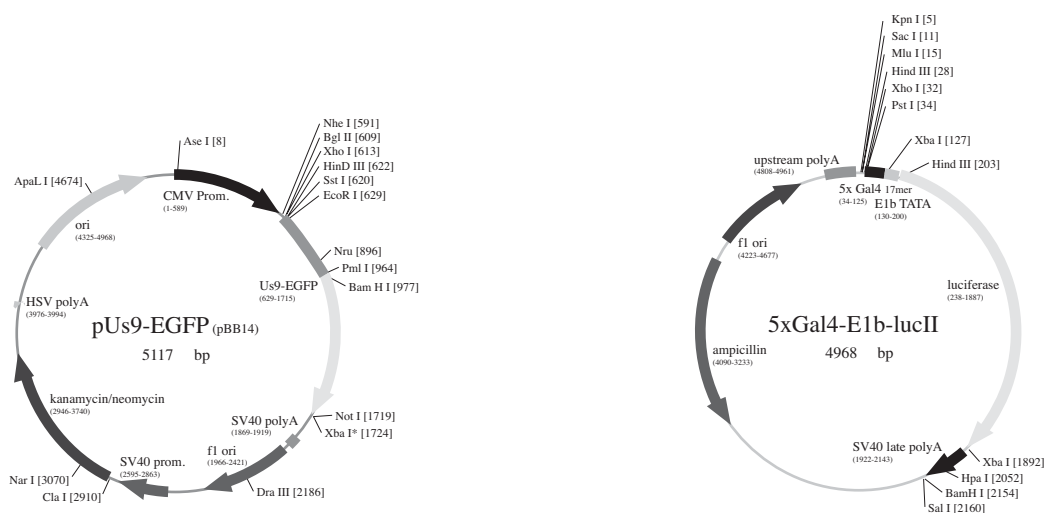
- Yasui W.**, H. Kuniyasu, H. Yokozaki, S. Semba, F. Shimamoto und E. Tahara. (1996). Expression of cyclin E in colorectal adenomas and adenocarcinomas: correlation with expression of Ki-67 antigen and p53 protein. *Virchows Arch* 429, 13-9.
- Yeh K.H.**, T. Kondo, J. Zheng, L.M. Tsvetkov, J. Blair und H. Zhang. (2001). The f-box protein skp2 binds to the phosphorylated threonine 380 in cyclin e and regulates ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 884-90.
- Zachariae W.** (1999). Progression into and out of mitosis. *Curr Opin Cell Biol* 11, 708-16.
- Zachariae W.** und K. Nasmyth. (1999). Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* 13, 2039-58.
- Zariwala M.**, J. Liu und Y. Xiong. (1998). Cyclin E2, a novel human G1 cyclin and activating partner of CDK2 and CDK3, is induced by viral oncoproteins. *Oncogene* 17, 2787-98.
- Zerfass K.**, A. Schulze, D. Spitkovsky, V. Friedman, B. Henglein und P. Jansen-Durr. (1995). Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol* 69, 6389-99.
- Zhang H.**, Y. Xiong und D. Beach. (1993). Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Biol Cell* 4, 897-906.
- Zhang H.S.**, M. Gavin, A. Dahiya, A.A. Postigo, D. Ma, R.X. Luo, *et al.* (2000). Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* 101, 79-89.
- Zhang P.**, C. Wong, R.A. DePinho, J.W. Harper und S.J. Elledge. (1998). Cooperation between the Cdk inhibitors p27(KIP1) and p57(KIP2) in the control of tissue growth and development. *Genes Dev* 12, 3162-7.
- Zhang P.**, C. Wong, D. Liu, M. Finegold, J.W. Harper und S.J. Elledge. (1999). p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes Dev* 13, 213-24.
- Zhao J.**, B. Dynlacht, T. Imai, T. Hori und E. Harlow. (1998). Expression of NPAT, a novel substrate of cyclin E-CDK2, promotes S- phase entry. *Genes Dev* 12, 456-61.
- Zhao J.**, B.K. Kennedy, B.D. Lawrence, D.A. Barbie, A.G. Matera, J.A. Fletcher, *et al.* (2000). NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene transcription. *Genes Dev* 14, 2283-97.
- Zhu X.**, M. Ohtsubo, R.M. Bohmer, J.M. Roberts und R.K. Assoian. (1996). Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J Cell Biol* 133, 391-403.
- Zindy F.**, D.E. Quelle, M.F. Roussel und C.J. Sherr. (1997a). Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* 15, 203-11.
- Zindy F.**, H. Soares, K.H. Herzog, J. Morgan, C.J. Sherr und M.F. Roussel. (1997b). Expression of INK4 inhibitors of cyclin D-dependent kinases during mouse brain development. *Cell Growth Differ* 8, 1139-50.
- Zuo L.**, J. Weger, Q. Yang, A.M. Goldstein, M.A. Tucker, G.J. Walker, *et al.* (1996). Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 12, 97-9.

7. Anhang

7.1 Plasmide & Oligodesoxynukleotide







pBlueBacHisA: ATG-RGS-6xHis-EK-site...

ATG CGG GGT... GAC GAT GAC GAT AAG GGA TCG ATG GGG ATC CGA GCT CGA GAT CTG CAG CTG GTA CCA TGG AAT TCG AAG CTT

Cla I *Bam* H I *Sac* I *Xho* I *Bgl* II *Pst* I *Kpn* I *Eco* R I *Hind* III

pDsRed1-N1: *DsRed1*

GAC TCA GAT CTC GAG CTC AAG CTT CGA ATT CTG CAG TCG ACG GTA CCG CGG GCC CGG GCC CGG GAT CCA CCG GTC GCC ACC ATG GTG

Bgl II *Xho* I *Sac* I *Hind* III *Eco* R I *Pst* I *Sal* I *Kpn* I *Sac* II *Apa* I *Sma* I *Bam* H I

pDsRed1-N3: *DsRed1*

GA CTC AGA TCT CGA GCT CAA GCT TCG AAT TCT GCA GTC GAC GGT ACC GCG GGC CCG GGC CCG GGA TCC ATC GCC ACC ATG GTG

Bgl II *Xho* I *Sac* I *Hind* III *Eco* R I *Pst* I *Sal* I *Kpn* I *Sac* II *Apa* I *Sma* I *Bam* H I

pEGFP-N3: *EGFP*

GA CTC AGA TCT CGA GCT CAA GCT TCG AAT TCT GCA GTC GAC GGT ACC GCG GGC CCG GGC CCG GGA TCC ATC GCC ACC ATG GTG

Bgl II *Xho* I *Sac* I *Hind* III *Eco* R I *Pst* I *Sal* I *Kpn* I *Sac* II *Apa* I *Sma* I *Bam* H I

pEBFP-N3: *EBFP*

GA CTC AGA TCT CGA GCT CAA GCT TCG AAT TCT GCA GTC GAC GGT ACC GCG GGC CCG GGC CCG GGA TCC ATC GCC ACC ATG GTG

Bgl II *Xho* I *Sac* I *Hind* III *Eco* R I *Pst* I *Sal* I *Kpn* I *Sac* II *Apa* I *Sma* I *Bam* H I

pFLAG-N3: FLAG-Epitop STOP

GA CTC AGA TCT CGA GCT CAA GCT TCG AAT TCT GCA GTC GAC GGT ACC GCG GGC CCG GGC CCG GGA TCC ATG GAC ... GAT AAA TAG TCT AGA

Bgl II *Xho* I *Sac* I *Hind* III *Eco* R I *Pst* I *Sal* I *Kpn* I *Sac* II *Apa* I *Sma* I *Bam* H I *Xba* I*

pGex4T2: GST-Thrombin-site...

ATG TCC CCT... CTG GTT CCG CGT GGA TTC CCA GGA ATT CCC GGG TCG ACT CGA GCG GCC GCA TCG TGA

Bam H I *Eco* R I *Sma* I *Sal* I *Xho* I *Not* I

Oligodesoynukleotide für die PCR:

cycE-1-395-sense-Primer: <i>Xho</i> I-Kozak-cds	<u>ACCTCGAGCCAGCCATGAAGGAGGACGGCGGCG</u>
cycE-1-395-reverse-Primer: <i>Eco</i> R I-cds	<u>TCGAATTCTCACGSSATTTCCGGCCCG</u>
cycE-1-350-reverse-Primer: <i>Eco</i> R I-cds	<u>CGGAATTCTCAGTCTCTGTGGGTCTGTATG</u>
cycE-50-395-sense-Primer: <i>Xho</i> I-Kozak-cds	<u>ACCTCGAGCCAGCCATGGCAGTCTGTGCAGACCCC</u>
cycE-100-395-sense-Primer: <i>Xho</i> I-Kozak-cds	<u>ACCTCGAGCCAGCCATGGTCTGGAAAATCATGTTAA</u>
cycE-129-395-sense-Primer: <i>Xho</i> I-Kozak-cds	<u>ACCTCGAGCCAGCCATGCGAGCAATTCTTCTGG</u>
cycE-219-395-sense-Primer: <i>Xho</i> I-Kozak-cds	<u>ACCTCGAGCCAGCCATGAAGGCCCTTAAGTGGC</u>
cycE-298-395-sense-Primer: <i>Xho</i> I-Kozak-cds	<u>ACCTCGAGCCAGCCATGCAAAAGGTTTCAGGGT</u>
cycD1-sense-Primer: <i>Eco</i> R I-Kozak-cds	<u>CGGAATTCCCAGCCATGGAACACCAGCTCCTGT</u>
cycD1-sense-Primer: <i>Bam</i> H I-Kozak-cds	<u>GTGGATCCCCAGCCATGAACTACCTGGACC</u>
cycD1-reverse-Primer: <i>Eco</i> R I-cds	<u>TCGAATTCTCACATGGCGGCCAGGTTCCAC</u>
cycA-sense-Primer: <i>Eco</i> R I-Kozak-cds	<u>CGGAATTCCCAGCCATGTTGGGCAACTCTGCGC</u>
p16-sense-Primer: <i>Eco</i> R I-Kozak-cds	<u>CGGAATTCCCAGCCATGGAGCCGGCGGCGGGGA</u>
p21-sense-Primer: <i>Xho</i> I-Kozak-cds	<u>ACCTCGAGCCAGCCATGTGAGAACCGGCTGGGGATG</u>
p21-revers-Primer: <i>Xho</i> I-cds	<u>ACCTCGAGTTAGGGCTTCCTCTTGAG</u>
p21-revers-Primer: <i>Bgl</i> II-cds	<u>GAAGATCTTTAGGGCTTCCTCTTG</u>
p27-sense-Primer: <i>Xho</i> I-Kozak-cds	<u>ACCTCGAGCCAGCCATGTCAAACGTGCGAGTGT</u>
p27-revers-Primer-cds: <i>Xho</i> I	<u>ACCTCGAGTTACGTTTGACGTCTTCTG</u>
p27-revers-Primer: <i>Bgl</i> II-cds	<u>GAAGATCTTTACGTTTGACGTCTTCTG</u>
p57-sense-Primer: <i>Eco</i> R I-Kozak-cds	<u>CGGAATTCCCAGCCATGTCCGACGCGTCCCTCC</u>
p57-revers-Primer: <i>Bam</i> H I-cds	<u>CGGGATCCTCACCAGCAGCTCTTG</u>
cdk2-sense-Primer: <i>Xho</i> I-Kozak cds	<u>ACCTCGAGCCAGCCATGGAGAACTTCCAAAAGG</u>
cdk2-revers-Primer: <i>Xho</i> I-cds	<u>ACCTCGAGTCAGAGTCGAAGATGGGGT</u>
cdk4-sense-Primer: <i>Eco</i> R I-Kozak-cds	<u>CGGAATTCCCAGCCATGGCTACCTCTCGATATG</u>
Cul1-Kozak-sense- <i>Bam</i> H I	<u>CGGGATCCACCATGTCGTCAACCCGGAGCCAG</u>
Cul1-rev-int- <i>Spe</i> I	<u>CAC TAGTACAGTAGTTATAAACAT</u>
Cul1-sense-int- <i>Xho</i> I	<u>ACCTCGAGTCCCTGTGATCAAGAAAT</u>
cycE-C-Fusionsprimer: <i>Bgl</i> II –no Stop-cds	<u>GAAGATCTCGCCATTTCCGGCCCCGCTG</u>
cycE-1-215-C-Fusionsprimer: <i>Bgl</i> II –no Stop-cds	<u>GAAGATCTTTCCATGGTGAGAATTTTCATCTCC</u>
cycE-1-250-C-Fusionsprimer: <i>Bgl</i> II –no Stop-cds	<u>GAAGATCTACTTCATGTAAAGTCATT</u>
cycE-1-300-C-Fusionsprimer: <i>Bgl</i> II –no Stop-cds	<u>GAAGATCTCTTTTGATCAATTCAGAT</u>
cycE-1-350-C-Fusionsprimer: <i>Bgl</i> II –no Stop-cds	<u>GAAGATCTGTCTCTGTGGGTCTGTATGTTG</u>
cycE-1-365-C-Fusionsprimer: <i>Bgl</i> II –no Stop-cds	<u>GAAGATCTCAACATGGCTTTCTTTGCTCGG</u>
cycD1-C-Fusionsprimer: <i>Bgl</i> II –no Stop-cds	<u>CGGGATCCGATGTCCACGTCCCGCACG</u>
cycA-C-Fusionsprimer: <i>Bam</i> H I –no Stop-cds	<u>CGGGATCCCAGATTTAGTGTCTCTGGT</u>
p16-C-Fusionsprimer: <i>Bam</i> H I –no Stop-cds	<u>CGGGATCCATCGGGGATGTCTGAGGG</u>
p21-sense-N-Fusionsprimer: <i>Bam</i> H I –cds	<u>CGGGATCCATGTGAGAACCGGCTG</u>
p21-C-Fusionsprimer: <i>Bgl</i> II –no Stop-cds	<u>GAAGATCTGGGCTTCCTCTTGAGAGAAG</u>
p27-sense-N-FusionsPrimer: <i>Bam</i> H I –cds	<u>CGGGATCCATGTCAAACGTGCGAG</u>
p27-revers-C-Fusionsprimer: <i>Bgl</i> II –no Stop-cds	<u>GAAGATCTCGTTTGACGTCTTCTGAGG</u>
p57-sense-N-Fusionsprimer: <i>Bam</i> H I –cds	<u>CGGGATCCATGTCCGACGCGTCCCTCCG</u>
p57-revers-C-Fusionsprimer: <i>Bam</i> H I –no Stop-cds	<u>CGGGATCCCCGCAGCCTCTTGCGCGGGG</u>
p57-revers-C-Fusionsprimer: <i>Bam</i> H I –no Stop-cds	<u>TAGGATCCTCGCAGCTCTTGCGCGGGGTC</u>
p57-revers-C-Fusionsprimer: <i>Bam</i> H I –no Stop-cds	<u>TAGGATCCTCGCAGCCTCTTGCGCGGGGTCGT</u>
cdk2-N-Fusionsprimer: <i>Bam</i> H I –cds	<u>CGGGATCCATGGAGAACTTCCAAAAGG</u>
cdk2-C-Fusionsprimer: <i>Bam</i> H I –no Stop-cds	<u>GAGGATCCGAGTCGAAGATGGGGTACT</u>
cdk4-C-Fusionsprimer: <i>Bam</i> H I –no Stop-cds	<u>CGGGATCCCTCCGGATTACCTTCATCC</u>
cullin1-C-Fusionsprimer: <i>Bam</i> H I –no Stop-cds	<u>CGGGATCCAGCCAAGTAACTGTAGGTGTCCT</u>
PCR-Oligo zur Veränderung des Leserahmens in pDsred1 von -N1 nach -N3	<u>inCGGGATCCATCGCCACCATGGTGCGCTCCTCC</u>

Oligodesoynukleotide für die DNA-Sequenzierung:

T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	AATACGACTCACTATAG
Sp6	ATTTAGGTGACACTATA
Sequenzierprimer pEGFP-N1-3 (sense): 543-560	GGTGGGAGGTCTATATAA
Sequenzierprimer pEGFP-N1-3 (reverse): 777-760	CGCCCTCGCCGGACACGC
Sequenzierprimer für pBlueBacHisA: 6034-6015	GAAGCGGGTCCAAGTTTCCC
cycE-Sequenzierprimer: cds213-196	AACCCGGTCATCATCTTC
cycE-Sequenzierprimer: cds148-165	AATGCAGTCTGTGCAGAC
cycE-Sequenzierprimer: cds341-358	GGGATCAGCACTTTCCTTG
cycE-Sequenzierprimer: cds549-566	TGCAGCCAAACTTGAGGA
cycE-Sequenzierprimer: cds746-763	AAGTGCTACTGCCGCAGT
cycE-Sequenzierprimer: cds944-961	GGATGGTTCCATTTGGCA
cycE-Sequenzierprimer: cds996-980	CTTCAGTTTTGAGCTCC
p27-Sequenzierprimer: cds433-450	GCGGAGCAATGCGCAGGA

Oligodesoynukleotide für Klonierungen:

Oligo kodierend für FLAG-tag (sense)	TAGGATCCATGGACTACAAAGACGATGACGATAAAT AGTCTAGAGC
Oligo kodierend für FLAG-tag (reverse)	GCTCTAGACTATTTATCGTCATCGTCTTTGTAGTCCA TGGATCCTA
Oligo kodierend für cdk2-Substratsequenz (sense)	GATCCGGTGGTCACCACGCTTCTCCGCGTAAAGGTG GTG
Oligo kodierend für cdk2-Substratsequenz (reverse)	TCGACACCACCTTTACGCGGAGAAGCGTGGTGACCA CCG
Oligo kodierend für mutierte cdk2-Substratsequenz (sense)	GATCCGGTGGTCACCACGCTGCTCCGCGTAAAGGTG GTG
Oligo kodierend für mutierte cdk2-Substratsequenz (reverse)	TCGACACCACCTTTACGCGGAGCAGCGTGGTGACCA CCG
Oligo für neue MCS in pM/PVP16 (sense)	AATTCCTCGAGGGATCCTGCAGATCTA
Oligo für neue MCS in pM/PVP16 (reverse)	AGCTTAGATCTGACGGATCCCTCGAGG

7.2 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Aumüller, Beato, Elsässer, Frenking, Fruhsdorfer, Fuhs, Garten, Gemsa, Golenhofen, Habermehl, Hartmann, Herrler, Ihm, Kaffarnik, Kern, Kirchner, Klenk, Koolman, Lang, Lauer, Löffler, v. Löw, Lorbert, Lührmann, Mannherz, Möröy, Müller, Niessing, Petzold, Reufel, Röhm, Schachtschabel, Schindler, Schulz, Seifart, Seitz, Siegel, Suske, Uniscker, Vogt, Wesemann, Westphal, Wiegandt

7.3 Lebenslauf

Name: Christoph Geisen
Geburtsdatum: 24.1.1969
Geburtsort: Bendorf/Rhein
Anschrift: Lenbachstraße 10, 45147 Essen

Schulbildung:

August 1975 - Juni 1979 Grundschole in Bendorf-Sayn
 August 1979 - Juni 1988 Johannesgymnasium Lahnstein
 Abschluß mit dem Abitur, 25.6.1988

Dienstzeit:

Januar 1989 – März 1990 Grundwehrrdienst in Koblenz

Universitätsausbildung:

Oktober 1990 - Dezember 1995 Philipps Universität Marburg
 Fachrichtung: Humanbiologie
 Abschluß mit der Erlangung des akademischen Grades
 „Diplom-Humanbiologe“, 22.12.1995
 Januar 1995 - Dezember 1995 Diplomarbeit am Deutschen Krebsforschungszentrum
 Heidelberg in der Abteilung Tumorbiochemie von
 Prof. D. Keppler, Thema der Diplomarbeit:
 „Transfektion von Multidrug Resistance Protein (MRP)
 überexprimierenden Zellen mit
 Glucuronosyltransferasen“
 April 1996 - heute Beginn der Promotion am Institut für Zellbiologie
 (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen, in
 der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Möröy, Thema der
 Dissertation: „Cyclin E: Struktur- Funktionsbeziehung
 und Implikationen für die Tumorentstehung.“

Wissenschaftliche Beschäftigung:

April 1996 – heute wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Zellbiologie
 (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen, in
 der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Möröy

7.4 Publikationsliste

Während der Promotionszeit wurden an folgenden Originalartikeln mitgearbeitet:

Haas Kirsten, Peter Staller, **Christoph Geisen**, Jiri Bartek, Martin Eilers und Tarik Möröy (1997).

Mutual requirement of CDK4 and Myc in malignant transformation: evidence for cyclin D1/CDK4 and p16^{INK4A} as upstream regulators of Myc.
Oncogene 15, 179-92.

Haas Kirsten, Christian Johannes, **Christoph Geisen**, Thorsten Schmidt, Holger Karsunky, Sabine Blass-Kampmann, Günther Obe und Tarik Möröy (1997).

Malignant transformation by cyclin E and Ha-Ras correlates with lower sensitivity towards induction of cell death but requires functional Myc and CDK4.
Oncogene 15, 2615-23.

Herrmann Christian, Christoph Block, **Christoph Geisen**, Kirsten Haas, Christoph Weber, Günther Winde, Tarik Möröy und Oliver Müller (1998).

Sulindac sulfide inhibits Ras signaling.
Oncogene 17, 1769-76.

Braun Katja, Gabriele Hölzl, Thomas Soucek, **Christoph Geisen**, Tarik Möröy und Markus Hengstschläger (1998).

Investigation of the cell cycle regulation of cdk3-associated kinase activity and the role of cdk3 in proliferation and transformation.
Oncogene 17, 2259-69.

Karsunky Holger, **Christoph Geisen**, Thorsten Schmidt, Branko Zevnik, Eva Gau und Tarik Möröy (2000).

Oncogenic potential of cyclin E in T-cell lymphomagenesis in transgenic mice: evidence for co-operation between cyclin E and RAS but not MYC
Oncogene 18, 7816-24.

Beneke Ralph, **Christoph Geisen**, Branko Zevnik, Thomas Bauch, Wolfgang-Ulrich Müller, Jan-Heiner Küpper und Tarik Möröy (2000).

DNA excision repair and DNA damage-induced apoptosis are linked to Poly(ADP-ribosyl)ation but have different requirements for p53.
Mol Cell Biol 20, 6695-703.

Karaguni Ioanna-Maria, Karl-Heinz Glüsenkamp, Anette Langerak, **Christoph Geisen**, Volker Ullrich, Günther Winde, Tarik Möröy und Oliver Müller (2002).

New indene-derivatives with anti-proliferative properties.

Bioorg. & Medic. Chem. Lett. 2002 in press

Mädge Britta, **Christoph Geisen**, Tarik Möröy and Manfred Schwab.

Inhibitory influence of Yaf2 on Myc biological function.

submitted

Geisen Christoph , Holger Karsunky und Tarik Möröy (2001).

Cyclin E overexpression and p27^{Kip1}-deficiency cooperate in lymphomagenesis.

in Vorbereitung.

Geisen Christoph und Tarik Möröy (2001).

Oncogenic activity of excess cyclin E is not linked to its CDK2 activation but relies on its ability to neutralize CKIs.

in Vorbereitung.

Hennemann Hanjo, **Christoph Geisen**, Lothar Vaßen, Angelika Warda and Tarik Möröy.

Influence of Krim1 on Myc biological function.

in preparation

7.5 Danksagung

Allen **ehemaligen und aktuellen Mitgliedern** der Arbeitsgruppe gilt mein Dank für ein hervorragendes Arbeitsklima und ein tolerantes, abwechslungsreiches Miteinander. Ebenso möchte ich **allen Mitarbeitern** des Instituts für ihre Arbeit, Kollegialität und Hilfsbereitschaft ein Dankeschön sagen.

Ich danke Herrn **Prof. Dr. Tarik Möröy** für die Überlassung des Themas, sein stetes Interesse, seine immer offene Bürotür, sowie die finanzielle und organisatorische Fürsorge.

Die Damen **Eva Gau** und **Inge Spratte** möchte ich meiner großer Dankbarkeit versichern, ob Ihrer ordnenden Kraft im chaotischen Laboralltag und der Bereitstellung großer Mengen Puffer etc. und mehr oder weniger freiwillig von Kuchen, Keksen, Schokolade usw., nicht nur für Notsituationen.

Meiner Banknachbarin Frau **Angelika Warda** danke ich vielmals für das Ertragen vieler Launen und groben Scherze, sowie jeder Menge Hilfe und Dienste ohne die in der letzten Monaten wenig zusammengegangen wäre.

Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Tierpflegern, besonders bei **Petra Plessow** und **Thomas Civela**, deren Hilfsbereitschaft und Betreuung der Tiere viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn PD Dr. **Ludger Klein-Hitpaß** danke ich für die Einführung in das Baculovirus-System.

Weiterhin danke ich Herrn Dipl. Ing. **Klaus Lennartz** für tatkräftige Unterstützung bei diversen FACS-Analysen und Computerproblemen.

Insbesondere danke ich der unerschöpflichen Quelle handwerklicher Utensilien, grober Witze und „guter“ Laune, „Onkel“ **Hans Zieren**, für seine stete, große Hilfsbereitschaft.

Besonders möchte ich meinen langjährigen Weg-, Wohnungs-, Studien- und Arbeitsgefährten Dipl. hum. biol **Esther Hedderich** und Dr. **Bernd Rödel** für viele nicht nur computergestützte und -unterstützende Hilfestellungen und eine tolle Freundschaft danken.

Desweiteren gebührt Frau Dr. **Beate Fraß** großes Lob für organisatorisches Engagement, herzlicher Dank für Ihre überdimensionierte Hilfsbereitschaft und Kooperation, sowie die akkustische Prägung des Laboralltags. Ihr werde hohe Anerkennung als Mitstreiterin und Kombatandin für den Erhalt des frühestmöglichen Aufstehens zuteil und! Weiterhin verleihe ich Ihr den Titel: „Miss Word 2001“!

Herrn Dr. **Holger Karsunky** schulde ich Dank für die vielseitigste Generosität, die sich nur denken lässt und eine hoffentlich weiterhin andauernde gute Freundschaft.

Auch **Manuela Brom**, Dr. **Markus Böhler**, **Ulrike Buchholz**, Dr. **Inka Leier** †, Dr. **Gabriele Jedlitschky** und Prof. Dr. **Albin Pourtier-Manzanedo** möchte ich für die Vermittlung essentieller Laborweisheiten und gute Freundschaften von Herzen danken.

Herzlichen Dank an alle die in den letzten Zügen zur Vollendung, Korrektur und Drucklegung dieses „Werkes“ beigetragen haben: **Beate, Bernd, Britta, Hans, Holger, Klaus, Lothar** und **Vadder**.

Nicht zuletzt danke ich Frau Dr. **Britta Mäde**, durch deren Liebe und Verständnis die letzten beiden Jahre viel schöner geworden und im Nu verflogen sind.

Zuletzt, aber im höchsten Maße, gilt mein aufrichtiger Dank **meiner gesamten Familie**, die sich in den letzten, gut 32 Jahren stets um mein Fortkommen bemüht hat, mir alle Hilfestellungen und Unterstützungen zukommen ließ, deren sie fähig war und immer an mich geglaubt hat.

7.6 Ehrenwörtliche Erklärungen

Hiermit erkläre ich, gemäß §6 Abs.3, Nr.6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 17.04.2001

(Christoph Geisen)

Hiermit erkläre ich, gemäß §6 Abs.3, Nr.6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und daß diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 17.04.2001

(Christoph Geisen)

Hiermit erkläre ich, gemäß §6 Abs.3, Nr.6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich das Arbeitsgebiet, das das Thema „Cyclin E: Struktur – Funktionsbeziehungen und Implikationen für die Tumorentstehung“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Christoph Geisen befürworte.

Essen, den 17.04.2001

(Prof. Dr. Tarik Möröy)